



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**BIOLOGICKÉ ÚČINKY KOMPLEXNÍCH EXTRAKTŮ
Z KVASINKOVÉ A ŘASOVÉ BIOMASY**

BIOLOGICAL EFFECTS OF COMPLEX EXTRACTS FROM YEAST AND ALGAE BIOMASS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

David Bočán

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1502/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: David Bočán
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Název bakalářské práce:

Biologické účinky komplexních extraktů z kvasinkové a řasové biomasy

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. rešerše – přehled antioxidačně aktivních látek kvasinek a řas
2. optimalizace metod extrakce antioxidantů a dalších aktivních látek z biomasy karotenogenních kvasinek a mikrořas
3. stanovení antioxidačního účinku, cytotoxického účinku a SPF faktoru vybraných extraktů
4. vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

David Bočán
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývala optimalizací extrakce aktivních látek z mikrořas a karotenogenních kvasinek, charakterizací těchto extraktů a jejich testováním na lidských keratinocytech pro zjištění cytotoxicity těchto extraktů

V teoretické části byla vypracována literární rešerše shrnující základní vlastnosti těchto mikroorganismů a lidských keratinocytů společně se základními podmínkami pro jejich kultivaci. Poté zde byly shrnuty příklady antioxidačních látek obsažených v těchto mikroorganismech a jejich vlastnosti. Nakonec byl touto částí objasněn pojem cytotoxicity a způsoby jejího měření

V praktické části byla z mikrořas a karotenogenních kvasinek provedena řada extrakcí. Tyto extrakty byly následně charakterizovány. Měřen byl obsah fenolických látek, flavonoidů, chlorofylů a karotenoidů. Dále byla změřena antioxidační aktivita a SPF těchto extraktů. Nakonec byla stanovena také cytotoxicita vybraných extraktů pomocí MTT testu.

Klíčová slova

Mikrořasy, kvasinky, antioxidanty, karotenoidy, chlorofyly, extrakce, SPF, cytotoxicita.

Abstract

This bachelor thesis was focused on optimalization of extractions of active compounds from microalgae and carotenogenic yeasts. Other part of this work was focused on characterization of these extracts and their tests of cytotoxicity on human keratinocytes.

In theoretical part a literary research which summarizes the basic properties and cultivation conditions of used microorganisms was conducted. Then there were listed an examples of antioxidant compounds found in these microorganisms as well as their properties. Finally the term cytotoxicity and methods of its measurement were clarified.

The practical part of this thesis consists of series of extractions from mentioned microorganisms. These extracts were characterized by the content determination of phenolic and flavonoid compounds and also chlorophyll and carotenoid compounds. Determination of antioxidant capacity and SPF were done too. Lastly the cytotoxicity of chosen extracts was measured using the MTT test.

Keywords

Microalgae, yeast, antioxidants, carotenoids, chlorophylls, extraction, SPF, cytotoxicity.

BOČÁN, David. Biologické účinky komplexních extraktů z kvasinkové a řasové biomasy. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123937>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petra Matoušková.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování

Zde bych chtěl poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Petře Matouškové Ph.D. za trpělivost a odborné rady při sepisování mé práce. Dále bych rád poděkoval Ing. Renatě Pavelkové za cenné rady, ochotu a trpělivost při zpracování experimentální části. Také bych chtěl poděkovat mé rodině a přátelům za podporu a vytvoření příznivého prostředí, které mi umožnilo tuto práci vypracovat.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Teorie	10
2.1	Kvasinky.....	10
2.1.1	Karotenogenní kvasinky.....	10
2.1.2	Kultivace kvasinek	11
2.1.3	Růst buněk.....	13
2.2	Řasy.....	14
2.2.1	Jednobuněčné řasy.....	14
2.2.2	Kultivace mikrořas	15
2.3	Buněčné kultury	17
2.3.1	Buněčné linie.....	18
2.3.2	Primární kultury	18
2.3.3	Sekundární kultury	18
2.3.4	Kultivace buněk.....	18
2.3.5	Kultivační média	18
2.4	Volné radikály a další reaktivní částice v organismech	19
2.4.1	Reaktivní částice kyslíku (ROS)	19
2.4.2	Reaktivní částice dusíku (RNS)	20
2.5	Sekundární metabolity.....	21
2.6	Antioxidanty.....	22
2.6.1	Fenolické látky	22
2.6.2	Karotenoidy	24
2.6.3	Vitamín E	26
2.7	Antioxidační aktivita	27
2.8	Toxicita.....	27
2.8.1	Cytotoxicita	28
2.9	UV záření	29
2.10	Chemické UV filtry.....	30
2.11	SPF.....	30
3	Cíl práce	31

4	Experimentální část	32
4.1	Použité mikroorganismy	32
4.2	Použité lidské buňky	32
4.3	Použité chemikálie a materiál	32
4.4	Přístroje a pomůcky.....	33
4.5	Optimalizace extrakcí z mikrořas.....	33
4.5.1	Extrakce do vody a ethanolu	33
4.5.2	Extrakce do hexanu	33
4.6	Optimalizace extrakcí z karotenogenních kvasinek	34
4.6.1	Hexan	34
4.6.2	Hexan a DMSO	34
4.6.3	Hexan a ethanol	35
4.6.4	Extrakce dle Folche	35
4.6.5	Hexan a aceton	35
4.6.6	Ethanol	35
4.6.7	Ethanol a DMSO	35
4.6.8	Methanol, hexan a aceton	36
4.6.9	Methanol, DMSO, hexan a aceton	36
4.7	Charakterizace extraktů.....	36
4.7.1	Celková výtěžnost extraktů	36
4.7.2	Stanovení celkových fenolických látek	37
4.7.3	Stanovení flavonoidů.....	37
4.7.4	Stanovení antioxidační aktivity	37
4.8	Měření absorpčního spektra extraktů pomocí UV-VIS spektrofotometrie	38
4.8.1	Výpočet SPF.....	38
4.8.2	Stanovení celkových karotenoidů a chlorofylů v extraktech z mikrořas	38
4.8.3	Stanovení celkových karotenoidů v extraktech z karotenogenních kvasinek	38
4.9	Test cytotoxicity	39
4.9.1	Kultivace lidských keratinocytů	39
4.9.2	MTT test.....	39

5	Výsledky a diskuze.....	40
5.1	Extrakty z mikrořas	40
5.1.1	Extrakty z komerčně dostupných mikrořas	40
5.1.2	Extrakty ze vzorků mikrořas kultivovaných na FCH VUT.....	46
5.2	Extrakty z karotenogenních kvasinek	50
5.2.1	Extrakty z kvasinky <i>Cystofilobasidium Macerans</i> kultivované na FCH VUT	50
5.3	MTT test cytotoxicity extraktů z mikrořas.....	55
6	Závěr.....	57
7	Citovaná literatura	59
8	Seznam obrázků	68
9	Seznam tabulek	69
10	Seznam použitých zkratk.....	70

1 Úvod

Kvasinky a mikrořasy jsou jednobuněčné eukaryotické organismy. Zatímco kvasinky jsou klasifikovány jako mikroskopické houby a energii získávají oxidací, či fermentací organických látek (jsou chemoheterotrofní), řasy mají blíže spíše k jednoduchým rostlinám, protože získávají energii pomocí fotosyntézy (jsou fotoautotrofní) [1].

Kvasinky se často využívají jako modelový organismus pro různý výzkum, protože se jedná o nejjednodušší eukaryotický organismus. Jedná se tím pádem také o nejlépe prostudovaný eukaryotický organismus hojně využívaný v biosyntetických procesech. Díky znalosti celého genomu kvasinek se již využívá také různých úprav v jejich genomu a v důsledku i metabolismu pro získání námi požadovaného produktu [2].

Řasy jsou velmi velká a rozmanitá skupina organismů a dá se říci, že většina z nich má společného předka, ze kterého pochází jejich plastidy, díky kterým mohou fotosyntetizovat a tím jsou sinice (*Cyanobacteria*). A právě ty jsou zodpovědné za zvýšení hladiny kyslíku v Zemské atmosféře před cca 2,45 miliardami let a její přeměnu z tehdy redukující na oxidující, což vedlo ke vzniku života tak jak jej známe dnes [3].

Oba typy organismů se díky své univerzalitě a jednoduchosti, která přesto poskytuje více než uspokojivé výsledky, využívají ve velmi širokém záběru. Od výroby alkoholických nápojů jako je pivo a víno (kvasinky) [4] a čištění odpadních vod (řasy) [5] až po právě izolaci různých sekundárních metabolitů těchto organismů, které mají různé účinky od cytotoxických, kterých lze využívat například v onkologii při léčbě tumorů až po antioxidační, kterých zase lze využívat jako například doplňků stravy, či v kosmetice [6].

2 Teorie

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotní organismy spadající do říše hub (*Fungi*). Lidé je využívali již v neolitu před 6 000 až 8 000 lety ve starém Egyptě nebo Číně při produkci vína a jiných alkoholických kvašených nápojů, nebo chleba. Poprvé kvasinky pozoroval Anton van Leeuwenhoek v roce 1680 pomocí jednoduchého mikroskopu. Později je v roce 1837 Theodor Schwann zařadil do říše hub. Zabýval se jimi také Louis Pasteur a v roce 1861 na nich popsal Pasteurův efekt [7].

Dnes se jejich využití díky značným pokrokům v biochemii a genovém sekvenování značně rozšířilo a lidé jsou schopni je využívat i k produkci rozmanitých látek. Stačí správně zasáhnout do jejich fermentačního metabolismu a poskytnout jim správné prostředí. Některé tyto kvasinky produkují karotenoidy pro ochranu před oxidací reaktivními formami kyslíku, které mohou vznikat při dopadání slunečního záření na buňku (jsou to antioxidanty). Takovéto kvasinky jsou nazývány karotenogenní a je možné je využívat pro syntézu a následnou extrakci beta karotenu (provitaminu A). Kultivace kvasinek není nijak náročná právě proto, že se jedná o poměrně odolné organismy. Většinou postačí zaočkovat mikroorganismy například pomocí křížového roztěru na pevné kultivační médium v Petriho misce, nebo je umístit do fermentoru s vhodnými živinami a prostředím, pokud je požadováno větší množství biomasy [8].

2.1.1 Karotenogenní kvasinky

Karotenogenní kvasinky jsou taxonomicky podle způsobu rozmnožování řazeny do oddělení *Basidiomyceta* a *Ascomyceta*. Jako karotenogenní kvasinky jsou nazývány ty, které mají vyvinutý enzymatický aparát pro produkci karotenoidních pigmentů. Tyto kvasinky mají díky produkci těchto pigmentů a zároveň antioxidantů (například beta karoten, torulen či torularhodin) charakteristické oranžové až červené zbarvení. Proto jsou také někdy nazývány jako „červené kvasinky“. Nejznámější rody těchto kvasinek jsou *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Rhodosporidium* a *Cystofilobasidium*. Zmíněné rody produkují poměrně velké množství karotenoidů [9].

2.1.1.1 Rod *Rhodotorula*

Tyto kvasinky produkují kromě beta karotenu také lipidy, které se pak akumulují v cytosolu [10]. Buňky kvasnic tohoto rodu bývají válcovitého tvaru a jejich barva bývá poměrně rozmanitá, záleží na druhu. Většinou se ovšem pohybuje v odstínech červené právě díky produkci karotenoidů. Jsou schopny prosperovat i v prostředích chudých na dusík. Díky tomu se vyskytují ve vzduchu, vodě, půdě na povrchu různých rostlin a dokonce i v orgánech některých živočichů a to téměř všude na světě a tak jsou považovány za patogenní [11]. Do tohoto rodu patří například *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* nebo *Rhodotorula minuta* [12].

2.1.1.2 Rod *Sporobolomyces*

Buňky tohoto rodu nemají schopnost fermentace, zato ale produkují velké množství karotenoidů, především beta karoten, torulen a tolurharodin. Buňky kvasinek tohoto druhu jsou převážně elipsovitého tvaru výrazně červené barvy díky silné karotenogenezi. Patří sem například *Sporobolomyces salmonicolor*, *Sporobolomyces koalae* a *Sporobolomyces magnisporus* [12].

2.1.2 Kultivace kvasinek

Úspěšná kultivace kvasinek, čili taková, která poskytne co nejvíce biomasy, závisí na mnoha faktorech. Kvasinky sice jsou poměrně nenáročné organismy, ale pro jejich co nejrychlejší rozmnožování a co největší zisk biomasy, je potřeba udržet všechny tyto faktory v optimech charakteristických pro každou kultivovanou kvasinku [13]. Většinou se kvasinky kultivují v tekutých sladových médiích, což umožňuje kultivaci ve velkém objemu fermentoru, ale je také možné je kultivovat na agaru v Petriho miskách [14].

2.1.2.1 Teplota

Teplota je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících růst kvasinek. Pro každou kvasinku je charakteristická minimální teplota, při které se kvasinky množí nejnižší rychlostí, kterou je možno zjistit [15]. Při dalším pomalém snižování teploty na bod mrazu a níže kvasinky umírají v důsledku tvoření krystalků ledu z vody v cytoplasmě i mimo ni. Ty pak narušováním buněčných membrán buňky usmrcují. Naopak při rychlém snížení teploty se vytvoří pouze mikro krystalky ledu a ty usmrtí pouze malou část populace. U zbytku populace dojde pouze k zastavení biochemických pochodů. Toho lze využít k vytváření lyofilizovaných kultur, které je možno uchovávat i několik let při zachování jejich životaschopnosti. Dále je pro kvasinky charakteristická optimální teplota, při které se kvasinky rozmnožují nejrychleji a nakonec maximální teplota, což je teplota při které se kvasinky ještě jsou schopny rozmnožovat. Další zvýšení teploty pak vede k usmrcení buněk v důsledku denaturace enzymů a bílkovin obsažených v buňce. Kvasinky patří mezi mezofilní mikroorganismy, protože jejich optimální teplota se u většiny druhů pohybuje okolo 30 °C [13].

2.1.2.2 Vliv pH

Dalším významným faktorem ovlivňujícím rozmnožování kvasinek je pH. To totiž významně ovlivňuje jejich biochemickou činnost a každý druh kvasinek má vlastní, poměrně úzké rozmezí pH, které je pro něj optimální. U všech kvasinek se toto rozmezí ovšem pohybuje v kyselé oblasti (4,5–5,5). Už při velmi slabě alkalickém pH (cca 7,5) dochází k inhibici a zastavení jejich růstu [13].

2.1.2.3 Vodní aktivita

Vodní aktivita má velký vliv na rozmnožování jakéhokoliv mikroorganismu včetně kvasinek, protože téměř všechny jejich biochemické reakce se odehrávají ve vodním prostředí a samotné mikroorganismy jsou složeny z větší části z vody. Je vyjádřena poměrem tlaku vodních par určitého roztoku k tlaku vodních par nad destilovanou vodou za stejných podmínek [15].

U zředěných roztoků lze tlaky vodních par nahradit poměrem součtu molů vody a rozpuštěné látky ku počtům molů vody v daném roztoku. Tudíž čím více molů určité látky je rozpuštěno v roztoku, tím nižší je potom jeho vodní aktivita. Většina kvasinek potřebuje vodní aktivitu minimálně v rozmezí 0,91–0,88. Pokud je vodní aktivita nižší, dochází k zastavení růstu [13].

2.1.2.4 Redoxní potenciál

Tento potenciál je dán přítomností oxidačních a redukčních činidel v daném prostředí. Pokud se v něm vyskytuje přebytek silně redukujících látek, tak je záporný a u přebytku oxidujících látek je tomu naopak. Z hlediska kultivace kvasinek a dalších mikroorganismů se tento potenciál týká především přítomnosti kyslíku jako oxidačního činidla a jeho vlivu na mikroorganismy, podle čehož se mikroorganismy také dají rozdělit na obligátně a fakultativně aerobní, obligátně anaerobní a anaerobní. Většina kvasinek jsou fakultativně anaerobní organismy, tudíž nejsou na přítomnost kyslíku nijak životně vázány. Jsou schopny získávat energii aerobní respirací, ale v nepřítomnosti kyslíku (při záporném redoxním potenciálu) jsou schopny přežívat pomocí fermentace [13].

2.1.2.5 Záření

Vliv elektromagnetického záření na růst kvasinek se liší podle vlnové délky. Infračervené záření a Hertzovy vlny o delších vlnových délkách mohou mít negativní účinek na růst kvasinek pouze zahříváním kultivačního média na které působí. Viditelné světlo samo o sobě nemívá negativní účinek na růst kvasinek, spíše naopak například indukuje tvorbu karotenoidů u karotenogenních kvasinek. Zato UV záření a záření kratších vlnových délek jako je záření gamma, či Röntgenovo záření již na růst kvasinek působí velmi negativně. UV záření vyvolává mutace DNA, protože purinové a pyrimidinové báze nejsilněji absorbují právě v UV oblasti spektra a dochází tak k jejich excitaci a k tvorbě kovalentních vazeb mezi sousedními pyrimidinovými bázemi a ionizaci bází. Dále UV záření vyvolává tvorbu kyslíkatých radikálů, které dále mohou buňku poškozovat oxidačním stresem. Proti tomuto záření a následnému oxidačnímu stresu se právě karotenogenní kvasinky brání produkcí karotenoidních barviv, které jsou schopny energii tohoto záření přeměňovat na energii tepelnou, se kterou se kvasinka už vypořádá snáze než se zvýšenou hladinou kyslíkatých radikálů. Záření kratších vlnových délek působí obdobně, ale protože jeho fotony nesou ještě větší energii, tak mohou způsobovat navíc zlomy chromozomů a silnou ionizaci buněčného materiálu [13].

2.1.2.6 Kultivační média a nádoby

Pro správný růst potřebují kvasinky také médium se správným obsahem živin a dalších látek, tak aby se co nejvíce blížilo přirozenému prostředí kultivovaného druhu kvasinky. Díky tomu se také pak budou lépe množit a získá se větší růstový výtěžek [14]. Základní složky média, nezbytné pro správnou výživu kvasinek jsou, voda (viz. bod 2.1.2.3.), zdroj uhlíku a dusíku, fosfor, stopové prvky a růstové faktory. Dále potřebují, aby médium, ve kterém jsou kultivovány, bylo probubláváno kyslíkem (což zároveň zajistí promíchávání všech živin v médiu). To se provádí, pokud je fermentace nežádoucí, pokud je naopak žádoucí, probublává se vodíkem či oxidem uhličitým [13].

Jako zdroj uhlíku kvasinkám slouží především jednoduché sacharidy či polysacharidy, které jsou schopny metabolizovat pomocí glykolýzy a následně Krebsova cyklu, nebo pomocí fermentace [14].

Dusík jsou kvasinky schopny využívat jak organický vázaný v aminokyselinách (peptonech), tak ve formě anorganických amonných solí, dusičnanů a dusitanů [14].

Fosfor hraje důležitou roli při tvorbě ATP, které je základní molekulou pohánějící energeticky náročné procesy v buňce, také je součástí nukleotidů, fosfolipidů a dalších molekul esenciálních pro všechny buňky [15]. Přidává se do médií ve formě draselných, či sodných fosfátů [14].

Stopové a biogenní prvky se do živných médií přidávají pouze ve velmi malých koncentracích zjištěných experimentálně, protože vyšší by na kvasinky mohly působit toxicky. Patří mezi ně například železo, kobalt, chlór, vápník a draslík [14].

Kvasinky jako auxotrofní organismy si nejsou schopny syntetizovat pro ně specifické růstové faktory, jako jsou například purinové a pyrimidinové báze, různé vitamíny a vyšší mastné kyseliny. Proto je potřeba je do kultivačních médií přidávat [14].

Kultivační média mohou být zpevněná agarem, ty se pak po sterilizaci za tepla rozlévají do Petriho misek a po ztuhnutí se na ně mohou kvasinky naočkovat a nechat inkubovat [14]. Dále mohou být tekutá, ty je pak možno využít pro kultivaci větších objemů biomasy například v laboratorních fermentorech [13].

2.1.3 Růst buněk

Růst buněk se rozděluje do čtyř fází, které platí jak pro kvasinky, tak pro řasy a i například kultivované lidské buňky. Jsou to:

- **Lag fáze:** V této fázi se buňky přizpůsobují danému kultivačnímu médiu, do kterého jsou zaneseny. Nemnoží se, pouze se připravují na dělení.
- **Log fáze:** Po přizpůsobení se kultivačnímu médiu se buňky začnou množit velmi rychle, až exponenciálně. Rychlost množení má konstantní hodnotu a téměř všechny buňky jsou živé.
- **Stacionární fáze:** Po exponenciálním namnožení buněk dochází ke zpomalení množení buněk až dojde k jeho úplnému zastavení. To je způsobeno vyčerpáním živin z kultivačního média, stejně tak jako vyčerpáním prostoru, kam by se buňky mohly množit. Dojde k vytvoření jedné souvislé vrstvy buněk na kultivačním médiu v nádobce, pokud se kultivuje na pevném médiu, nebo na dně nádoby pokud se kultivuje v tekutém médiu a buňky přisedávají ke dnu nádoby. Také se začínají hromadit metabolity buněk a při další kultivaci za nezměněných podmínek nastává fáze odumírání buněk.
- **Fáze odumírání buněk:** V důsledku vyčerpání živin, prostoru a hromadění metabolitů buněk v kultivačním médiu začínají buňky hladovět a odumírat [15]

2.2 Řasy

Řasy jsou rozmanitá skupina fotoautotrofních organismů řadících se mezi nižší rostliny a jedny z nejstarších organismů na Zemi. Mohou být jak jednobuněčné jako například rod *Chlorella* nebo *Chlamydomonas*, ale i mnohobuněčné jako formy hnědých řas (chaluhy) a to například *Fucus vesiculosus* nebo *Macrocystis pyrifera*. Řasy získaly své chloroplasty pravděpodobně pomocí endosymbiózy, kdy pohltily některý z druhů *Cyanobacteria*. U některých druhů řas ovšem došlo k vývinu mixotrofie, stejně jako u masožravých rostlin [16]. Všechny řasy potřebují ke svému životu vodu a mohou růst jak ve sladké, tak slané vodě, kde jsou významnou součástí ekosystému, protože mnohobuněčné řasy slouží jako potrava pro vodní býložravce, jako úkryt pro menší živočichy a také produkují značnou část kyslíku v atmosféře. Jednobuněčné řasy jsou součástí fytoplanktonu, který také hraje významnou roli v ekosystému oceánů. Protože jsou to fotosyntetizující organismy, tak obsahují chlorofyly, ale také všechny obsahují beta karoten, který hraje důležitou roli ve fotosyntéze při ochraně proti vzniku kyslíkatých radikálů [17].

Řasy můžeme rozdělit na:

- *Chlorophyta* (Zelené řasy)
- *Rhodophyta* (Červené řasy)
- *Chromophyta* (Hnědé řasy)
- *Euglenophyta* (Krásnoočka)
- *Dinophyta* (Obrněnky)
- *Cryptophyta* (Skrytěnky)

První čtyři skupiny jsou většinou fotoautotrofní (některé druhy *Euglenophyt* jsou mixotrofní) a zbylé dvě bývají již mixotrofní [17].

2.2.1 Jednobuněčné řasy

Mikrořasy žijí individuálně, někdy v koloniích. Většina jich žije ve slané i sladké vodě. Netvoří ovšem složitější mnohobuněčné struktury a každá buňka je schopna individuální existence. Jejich velikost se pohybuje v řádech mikrometrů a byť jsou příbuzné rostlinám, nemají žádné struktury jako listy, kořeny či stonky [16]. Přestože jsou oproti vyšším rostlinám takto jednoduché, tak produkují značnou část kyslíku v atmosféře, a právě díky jejich jednoduchosti je možno je využívat k produkci a následně poměrně jednoduché izolaci požadovaných produktů od antioxidantů a vitaminů, po enzymy a mastné kyseliny [17].

2.2.1.1 Rod *Chlorella*

Tyto řasy spadají pod *Chlorophyta*. Mají kulovitý tvar a chybí jim bičíky. Množí se poměrně rychle i v ne příliš příznivých podmínkách a to díky tomu, že k prosperitě jim stačí pouze voda s malým množstvím rozpuštěných minerálních látek, sluneční svit a oxid uhličitý pro fotosyntézu [16]. Dá se tudíž poměrně snadno kultivovat, což je velmi výhodné kvůli vysoké nutriční hodnotě těchto řas, která dosahuje až 326 kcal na 100 g prášku této řasy. Tyto řasy obsahují vysoké množství proteinů, až 58 % svojí suché váhy. Dále také minerálů

a vitamínů. Také produkují značné množství tuků s podílem nenasycených mastných kyselin, proto se také dnes využívají jako doplněk stravy [17]. Také bylo prokázáno, že mají detoxikační účinky, protože mají schopnost na sebe vázat těžké kovy a odvádět je z organismu. Patří sem například *Chlorella vulgaris* a *Chlorella autotrophica* [18].

2.2.1.2 Rod *Chlamydomonas*

Tyto bičíkaté oválné řasy spadají také pod *Chlorophyta*. Jsou schopny přežít jak ve sladké, tak ve slané vodě a dokonce i ve sněhu (takto žije řasa *Chlamydomonas nivalis* a proto se jí někdy říká „sněžná řasa“). Živí se převážně fotoautotrofně, ale mohou přežívat také v temných prostorech, pokud mají k dispozici zdroj organického uhlíku, který mohou využít a tím pádem se živit heterotrofně jako například *Chlamydomonas reinhardtii*. Jinými slovy se tedy jedná o fakultativní heterotrofy [16]. Díky své poměrně jednoduché stavbě a jednoduché kultivaci se využívají jako modelový organismus v molekulární biochemii pro studium bičíkovitého pohybu a genetiky [17].

2.2.2 Kultivace mikrořas

Při kultivaci mikrořas je potřeba získat axenickou kulturu kmene, který je kultivován. Pokud by byla kultivovaná kultura kontaminovaná jiným kmenem nebo jinými mikroorganismy tak by mohlo docházet například ke vzniku nežádoucích metabolitů [16]. K izolování pouze jednoho kmene řasy se využívá například sérového ředění, křížového rozčtení na agaru anebo izolace pomocí kapilárních pipet. Také je možno použít určité promývací postupy [19].

2.2.2.1 Podmínky pro kultivaci

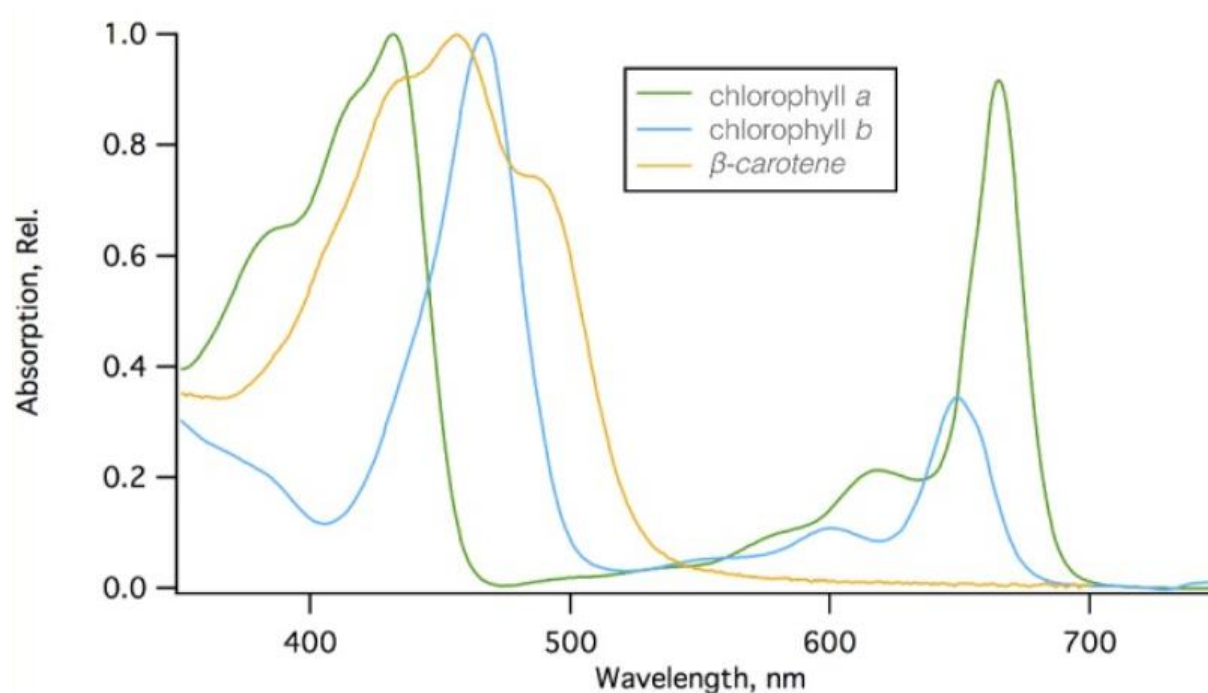
Správné podmínky pro kultivaci každého druhu řas jsou mírně odlišné, ale základem pro každou fotosyntetizující řasu je především dostatek světla a správné promíchávání, a tím pádem i dostatečná výměna kyslíku s oxidem uhličitým. Přesněji faktory ovlivňující kultivaci řas a jejich produkci biomasy jsou: množství a druh přítomných živin, intenzita osvětlení, hodnota pH, intenzita promíchávání a teplota [19].

2.2.2.2 Živiny

Mikrořasy vyžadují tři základní živiny a to uhlík, dusík a fosfor. Také vyžadují sekundární živiny jako například některé kovy (mangan, kobalt, železo, zinek, měď) nebo kovy alkalické a kovy alkalických zemin (draslík, vápník). Také některé polokovy a nekovy (křemík, síra) [16]. Tyto základní a sekundární živiny je potřeba dodávat ve formě například hnojiv, nebo je možné je nechat růst v odpadních vodách (ty již ovšem není možné využít pro extrakci účinných látek například pro medicínu, či kosmetiku). Regulací přísunu dusíku se ovlivňuje především produkce lipidů [19].

2.2.2.3 Intenzita osvětlení

Pro kultivaci mikrořas lze využít slunečního svitu, nebo umělého osvětlení v bioreaktorech. Řasy využívají především červené a modré oblasti vlnových délek světelného spektra, to je nutno zohlednit při výběru zářivky [16]. Vyplývá to z typu chlorofylu a dalších barviv, které obsahují a díky kterým jsou schopny absorbovat určité rozmezí vlnových délek světla (viz. Obrázek 1) a využívat tak jeho energii k fotosyntéze [19].



Obrázek 1: Absorpční spektra chlorofylů a beta karotenu [20]

2.2.2.4 Hodnota pH

Řasy nejlépe rostou při pH neutrálním až mírně zásaditém. Přibližné rozmezí je 7–9. Při vyšší hodnotě pH se velká část oxidu uhličitého ve vodě rozpouští na kyselinu uhličitou, která pak disociuje na uhličitanový aniont. Ten řasy již nejsou schopny využít a dochází ke stagnaci růstu [16], [19].

2.2.2.5 Teplota

Ideální teplota pro kultivaci se pohybuje v rozmezí 25 °C až 35 °C. Optimální teplota je individuální pro každý druh řasy, ale při vyšších teplotách by již mohlo docházet k denaturaci proteinů obsažených v řase. Naopak při nižších teplotách by docházelo k celkovému zpomalení metabolismu řasy, ne-li k jeho úplnému zastavení, což je také nežádoucí [16], [19].

2.2.2.6 Intenzita promíchávání

Intenzivním mícháním se zabráňuje sedimentaci řas, především těch nepohyblivých. Tím pádem mají všechny řasy rovnoměrný příjem živin i světla a nedochází k úhynu řas ve spodních a středových částech nádrže, ke kterým by se bez promíchávání moc světla nedostávalo [16]. Intenzivním promícháváním se také zajišťuje rovnoměrný přísun oxidu uhličitého a odvod odpadních látek fotosyntézy (kyslíku). Promíchávání ovšem nemůže být příliš intenzivní, neboť by docházelo k úhynu řas mechanickým poškozováním. Lze ho zajistit i pouhým probubláváním oxidem uhličitým [19].

2.2.2.7 Kultivační nádoby

Začíná se se startovní kulturou (inokulem), která se připravuje v laboratoři tak, že se umístí do skleněné nádoby s vodou, kterou probublává směs vzduchu s oxidem uhličitým. Také musí být nádoba velmi dobře osvětlená pro správný průběh fotosyntézy. Každá řasa ovšem vyžaduje specifické podmínky pro svůj správný růst, takže je nutné znát jejich přesnou biologii a tomu přizpůsobit podmínky ve startovací nádobě. Až je startovní kultura dostatečně rozrostlá, tak se s ní může pracovat dále. Může se například přemístit do velkých otevřených nádrží pro masovou produkci. Tyto nádrže jsou poměrně efektivní, co se produkce řas týče především díky tomu, že řasy vstřebávají přirozený sluneční svit a jsou v přímém kontaktu s okolním prostředím. Tímto procesem lze získat velké množství řas především pro komerční účely. Tato produkce se ovšem nedá tak dobře kontrolovat a může snadno dojít ke kontaminaci, takže jde o ne příliš předvídatelnou produkci řas. Produkují se takto ve velkém měřítku například řasy rodu *Chlorella*, které se poté používají jako doplněk stravy, krmivo a podobně [16]. Druhá možnost je kultivace řas v uzavřených nebo polouzavřených bioreaktorech. Ty mohou být osvětlovány buď přirozeným, nebo umělým světlem. Tyto bioreaktory bývají tvořeny systémem průhledných lahví propojených průhlednými trubicemi, aby přes ně mohlo procházet světlo. Většinou bývají propojeny do smyčky, aby v nich mohla kultura řas cirkulovat za pomoci čerpadel. Dále se cirkulující kultura řas probublává směsí oxidu uhličitého a vzduchu. Všechny tyto podmínky se v těchto bioreaktorech dají pečlivě kontrolovat a upravovat podle potřeby. To také znamená, že je možné téměř přesně reprodukovat podmínky kultivace. Je výrazně sníženo riziko kontaminace, neboť se jedná o uzavřený a pečlivě kontrolovaný systém [19].

2.3 Buněčné kultury

Jsou to jakékoliv eukaryotní buňky pěstované uměle v laboratoři za pomoci laboratorní techniky. Tyto buňky tvoří tkáň. Teoreticky takto můžeme pěstovat jakýkoliv typ buněk, musíme pouze nasimulovat ty správné podmínky. Primární buněčné kultury a buněčné linie jsou uchovávány různými organizacemi, které uchovávají zmrazeny jak lidské, tak živočišné a rostlinné buněčné linie. S jejich pomocí se pak může testovat například cytotoxicita určitých látek pro vývoj nových léčiv a dalších substancí [21].

2.3.1 Buněčné linie

Jedná se buňky jednoho typu, které jsou schopny rychle se dělit a adaptovat se kultivačnímu médiu, do kterého jsou zaneseny. Po určitém počtu dělení mohou umírat, nebo mohou mít charakter nádorových buněk, díky čemuž se dělí defacto do nekonečna, protože se u nich vyskytuje aktivní telomeráza, která zabraňuje zkracování telomer chromozómů a tím i stárnutí a umírání kultury. Získávají se například právě z nádorových buněk nebo z embryonálních tkání (kmenových buněk), nebo jsou vytvořeny transformací buněčných kmenů [21].

2.3.2 Primární kultury

Jsou to buňky odebrané přímo z tkáně určitého organismu. Kousek tkáně se rozsuspenderuje v živném roztoku a vzniká tak buněčná suspenze obsahující více typů buněk. Tato buněčná suspenze se pak nechá v Petriho, nebo jiných miskách, ve vhodném kultivačním médiu kultivovat v inkubátoru. Takto se kultivuje primární kultura, buňky přisedají ke dnu kultivační nádoby a začínají vytvářet souvislou vrstvu. Buňky se po čase již nejsou schopny dále rozmnožovat, protože vyčerpaly živiny kultivačního média i prostor, kam by se mohly dělit a začínají umírat. Proto se část buněk přenáší do dalšího média (pasážuje se) a tak vzniká sekundární kultura. [22].

2.3.3 Sekundární kultury

Díky kultivačnímu médiu pro primární kulturu, které obsahovalo živiny typické pro pouze jeden typ požadovaných buněk je sekundární kultura již složena pouze z tohoto typu buněk a lze ji využívat pro různé testování [21]. Jedná se o obyčejné somatické diploidní buňky, které se nejsou schopny neomezeně dělit a přirozeně stárnou. Z těchto kultur získáváme buněčné kmeny [22].

2.3.4 Kultivace buněk

Eukaryotické buňky vyšších živočichů jsou poměrně náročné na kultivaci a je potřeba jim zajistit co nejvhodnější prostředí pro růst. Je nutné vědět přesně jaký typ buněk se kultivuje a znát jeho biologii a podle toho se řídit. Musí být umístěny ve vhodném kultivačním médiu, které nahrazuje extracelulární tekutinu, také se musí pečlivě hlídat hladina oxidu uhličitého, kyslíku a teplota kultivačního média. Tyto faktory se většinou kontrolují ve speciálních inkubátorech. Také se musí pracovat ve striktně sterilním prostředí, aby nedošlo ke kontaminaci. Kultivační média také musí mít správné hodnoty řady dalších parametrů pro úspěšnou kultivaci [23].

2.3.5 Kultivační média

Kultivační médium nahrazuje extracelulární tekutinu. V tomto roztoku se nachází několik desítek složek, které poskytují buňkám ideální podmínky jako například udržení správného pH. Konkrétně se v kultivačním médiu nachází chlorid sodný, který upravuje osmotický tlak, anorganické soli, které udržují rovnováhu elektrolytů, uhličitán sodný udržující stabilní pH (v rozmezí 7,4–7,7), ten se udržuje speciální atmosférou v inkubátorech. Dále glukóza

jako zdroj energie, poté aminokyseliny, které slouží jako zdroj dusíku a vitamíny, ze kterých si buňky syntetizují kofaktory enzymů. Buňky se také musí nějak stimulovat k růstu, proto se v kultivačním médiu nachází i růstové hormony a živočišné sérum. Aby nedošlo ke kontaminaci bakteriemi, tak se přidávají i antibiotika. Protože samotným buňkám chybí transportní molekuly kyslíku (hemoglobin) je potřeba do kultivačního média přimíchat i antioxidační látky, které budou neutralizovat vznikající reaktivní formy kyslíku. Jako indikátor pH se používá fenolová červeň, která je při ideálním pH jasně červená, pokud dojde ke zežloutnutí znamená to, že kultivační médium je příliš kyselé a pokud zčernalo, tak je moc alkalické. V obou případech je potřeba kultivační médium vyměnit. Láhve s kultivačními médii se musí udržovat při stálé teplotě 37 °C, tedy teplotě organismu [23].

2.4 Volné radikály a další reaktivní částice v organismech

Volné radikály mohou být atomární i molekulární. Aby tyto částice mohly být považovány za radikály, musí v některém ze svých vazebných orbitalů obsahovat jeden nebo více nespárovaných elektronů. Díky tomuto nespárovanému elektronu se tyto částice mohou vázat i na velmi stabilní molekuly a napadat tak i například proteiny a další látky tvořící živý organismus, což může vést k jeho poškození. Volné radikály mohou vznikat homolytickým štěpením kovalentních vazeb za dodání určité formy energie, jako je například UV či ionizující záření nebo zvýšená teplota. Také mohou vznikat redoxními reakcemi, což je jejich častější forma vzniku v živých organismech [24]. V organismech ovšem nemají jen negativní účinek, například pro náš imunitní systém hrají nepostradatelnou roli, neboť je využívají fagocytující buňky k destrukci cizorodých organismů a dokonce hrají svou roli i v nervovém systému [25].

2.4.1 Reaktivní částice kyslíku (ROS)

I kyslík samotný se dá brát jako radikál, konkrétně diradikál, protože má ve svých orbitalech dva nespárované elektrony stejného spinu, jinak řečeno paralelní elektrony. Ovšem právě díky tomuto není jeho reaktivita tak velká jako u radikálů z něj odvozených, protože molekula kyslíku v základním stavu může oxidovat pouze ty atomy a molekuly, které mají ve svých orbitalech také paralelní elektrony, které pak mohou být kyslíkem přijaty do volných míst v jeho orbitalech. Radikály odvozené od molekuly kyslíku vznikají redukcí, přičemž redukce různými počty elektronů poskytne jiný typ radikálu. V aerobních organismech k těmto redukčním může docházet při redukcí kyslíku na vodu na konci dýchacího řetězce, neboť kyslík je v těchto organismech využíván jako finální akceptor elektronů [24].

- **Superoxid ($O_2^{\cdot-}$):** Tento anion radikál vzniká redukcí molekuly kyslíku jedním elektronem. Oproti dalším reaktivním formám kyslíku je poměrně málo reaktivní a může z místa svého vzniku difundovat do okolí a reagovat až později. Jeho reakce mohou poškozovat biomolekuly, ale spíše vedou k tvorbě jiných, více reaktivních forem kyslíku a spouští tak další cytotoxické reakce kyslíku [24].
- **Hydroxylový radikál (HO^{\cdot}):** Vzniká redukcí molekuly kyslíku třemi elektrony, z peroxidu vodíku například reakcí s redukovanými formami přechodných kovů, nebo za působení ionizujícího záření, díky kterému se molekula peroxidu štěpí homolyticky za vzniku dvou hydroxylových radikálů. Ty pak mohou v místě svého

vzniku reagovat s biomolekulami a poškozovat tak například biomembrány. Hydroxyl může biomolekulám odebírat H^+ a vytvářet tak radikály z nich, například alkoxylové ($RO\cdot$) nebo peroxylové radikály ($ROO\cdot$). Další způsob, jak z biomolekul mohou při působení hydroxylu vznikat radikály je přenosem nespárovaného elektronu na biomolekulu. Poslední způsob reakce je adice radikálu na biomolekulu [24].

- **Singletový kyslík (1O_2):** Existují dva typy singletového kyslíku. Pro oba platí to, že jeden z nespárovaných elektronů molekulárního kyslíku po excitaci změní svůj spin a tak se dostane na vyšší energetickou hladinu. Tento elektron se pak může spárovat s druhým nespárovaným elektronem a vyskytovat se tak ve stejném orbitalu, nebo může se změněným spinem zůstat nespárovaný ve svém orbitalu, ale tato konfigurace je velmi nestabilní. V tomto spočívá rozdíl mezi dvěma formami singletového kyslíku. Singletový kyslík se může vázat na biomolekuly, například lipidy a vytvářet z nich takto lipoperoxidy, nebo předávat svou excitační energii jiným molekulám a tak je excitovat [24].

Také existují reaktivní formy kyslíku, které ovšem nejsou radikály, jelikož neobsahují nespárovaný elektron.

- **Peroxid vodíku (H_2O_2):** Při vzniku peroxidu vodíku dochází k redukci molekuly kyslíku dvěma elektrony. Peroxid sám o sobě není radikál, protože nemá nespárovaný elektron, ale je intermediátem ke vzniku velmi reaktivního hydroxylového radikálu, který vzniká homolytickým štěpením této molekuly [24].
- **Ozón (O_3):** Ukazuje se, že i ozón se může vyskytovat v živých organismech jako biologický oxidant, podobně jako singletový kyslík. Může například oxidovat cholesterol v lidských cévách a vytvářet tak cholesterolové plaky vedoucí k ateroskleróze. Může se vyskytovat jako přízemní ozón, který má spíše negativní roli. Vzniká reakcemi ve smogu a pak působí negativně na živé organismy. Není to ovšem jeho jediná role, protože se vyskytuje i ve stratosféře jako nezbytný prvek ochrany před škodlivým zářením z kosmu (viz. bod 2.9) [26].

2.4.2 Reaktivní částice dusíku (RNS)

Dusíkaté reaktivní částice vznikají především z argininu působením enzymu NO-syntázy, která syntetizuje celou řadu radikálů odvozených od dusíku, jako je například oxid dusnatý a oxid dusičitý. Ty stejně jako kyslíkaté radikály mohou působit negativně, ale také mají řadu důležitých biologických funkcí v organismu [25].

- **Oxid dusnatý ($NO\cdot$):** Tento radikál se může vázat na hemoglobin, dále může reagovat se superoxidem a vytvářet peroxy-nitridový anion. Ten je velmi silným oxidačním činidlem, které může způsobovat lipoperoxidaci a po protonizaci se může rozkládat na velmi toxický hydroxylový radikál a oxid dusičitý [25]. Oxid dusnatý ovšem nemá jen negativní účinky na organismus, stimuluje například tvorbu cyklického guanosin monofosfátu, čímž ovlivňuje koncentraci vápníku v buňkách hladkého svalstva cév a vyvolává tak svalovou relaxaci. Tak ovlivňuje i cévní tonus a tím i krevní tlak. Také funguje obdobně jako neurotransmiter, jelikož při jeho velmi nízkých

koncentracích v mozku dochází ke zpomalení přenosové rychlosti synaptického signálu. Ovšem naopak při vyšších koncentracích začíná působit cytotoxicky a dochází k degeneraci neuronů [24].

- **Oxid dusičitý (NO_2^\cdot):** Může vznikat reakcí oxidu dusnatého s kyslíkem a je silným oxidantem a nitračním činidlem. Reakcí s další molekulou oxidu dusnatého vzniká molekula oxidu dusitého (N_2O_3), ta je pak oxidačním a nitrosylačním činidlem. Rychle ale hydrolyzuje na dvě molekuly dusitanového anionu, který je při vyšších koncentracích toxický [27].

Mezi reaktivní částice dusíku, které ovšem nejsou radikály patří:

- **Nitrosonium (NO^+):** Jako kation, kde má dusík oxidační číslo 3+ je velmi reaktivní a může vytvářet N-nitrosoaminy, které jsou karcinogeny. Dále může také vytvářet S-nitroso deriváty mající též cytotoxický efekt [25].
- **Dusitanový anion (NO_2^-):** Používá se v potravinářství jako konzervant a jeho nízké koncentrace se vyskytují i v pitné vodě. Ovšem pokud se dostane do těla ve vyšší koncentraci, tak působí velmi negativně. V krvi může ireversibilně reagovat s hemoglobinem za vzniku methemoglobinu. Ten pak ztrácí schopnost transportovat kyslík, což může vyústit až v hypoxii a anoxii. V přítomnosti sekundárních aminů s nimi reaguje za vzniku karcinogenních N-nitrosoaminů [28].
- **Dusičnanový anion (NO_3^-):** Jeho soli se používají jako hnojiva (například „Chilský led“), proto se vyskytuje v zelenině i v pitné vodě. Dusičnany se používají ale také jako konzervanty potravin stejně jako dusitany. Jejich použití je ovšem možné pouze za přidání například vitamínu C, který tlumí jejich negativní účinky. Intoxikace vyššími koncentracemi dusičnanů má podobné účinky jako dusitanová intoxikace, protože dusičnany se působením bakterií v gastrointestinálním traktu poměrně snadno redukuje na dusitany [29].
- **Peroxynitridový anion (ONOO^-):** Vzniká reakcí oxidu dusnatého se superoxidem a je poměrně stabilní, díky čemuž může difundovat i poměrně daleko do okolí od místa svého vzniku. Po protonizaci vzniká jeho konjugovaná kyselina peroxynitridová, která je velmi silným oxidantem biomolekul. Peroxynitrit je také schopen přímo nitrovat aminokyseliny, jako především tyrosin. Nitrotyrosin je pak markerem výskytu peroxynitridu v organismu [30].

2.5 Sekundární metabolity

Sekundární metabolity jsou organické molekuly, které přímo neovlivňují růst, rozmnožování nebo vývoj organismu. Spíše pouze zvyšují šanci organismu na přežití a předání své genetické informace do další generace. Sekundární metabolity tedy představují jistou evoluční výhodu. Jejich absence nemusí nutně znamenat smrt organismu, může to pouze znamenat například sníženou odolnost organismu a někdy se jejich absence nemusí projevit vůbec. Většinou hrají roli například při obraně organismu (jako u rostlin při obraně před býložravci nebo u kvasinek při obraně před UV zářením). Právě tyto sekundární metabolity jsou využívány jako léky (například antibiotika), pigmenty a další. Některé ze sekundárních metabolitů mohou mít


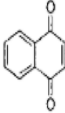


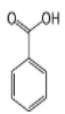


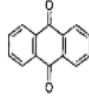

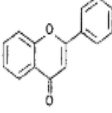
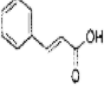
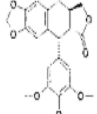

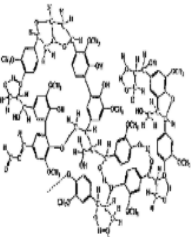


pozitivní účinky, protože působí jako antioxidanty a chrání buňku před oxidačním stresem, který může být indukován právě například UV zářením. Jiné na druhou stranu mohou mít toxické účinky na určité typy buněk, tudíž jsou pro ně cytotoxické [31].

2.6 Antioxidanty

Proti negativním účinkům volných radikálů zmíněných v bodě 2.4 se organismy chrání pomocí antioxidantů. Ty mohou být například enzymy, které buď brání samotné tvorbě radikálů, nebo s nimi reagují a zhasí je. Příklady mohou být enzym *Superoxid Dismutáza*, který katalyzuje přeměnu dvou molekul superoxidu na kyslík a peroxid vodíku, čímž zhasí superoxidový radikál. Dalším příkladem je enzym *Kataláza*, který rozkládá dvě molekuly peroxidu vodíku na vodu a kyslík a zabráňuje tak tvorbě hydroxylového radikálu z peroxidu vodíku [32]. Dále mohou antioxidanty mít formu jednotlivých molekul, které přímo reagují s vytvořenými radikály, a tak je zhasí. Antioxidant s radikálem reaguje tak, že se sám nechává oxidovat radikálem a zabráňuje tak oxidaci jiných biologicky důležitých látek [24].

2.6.1 Fenolické látky

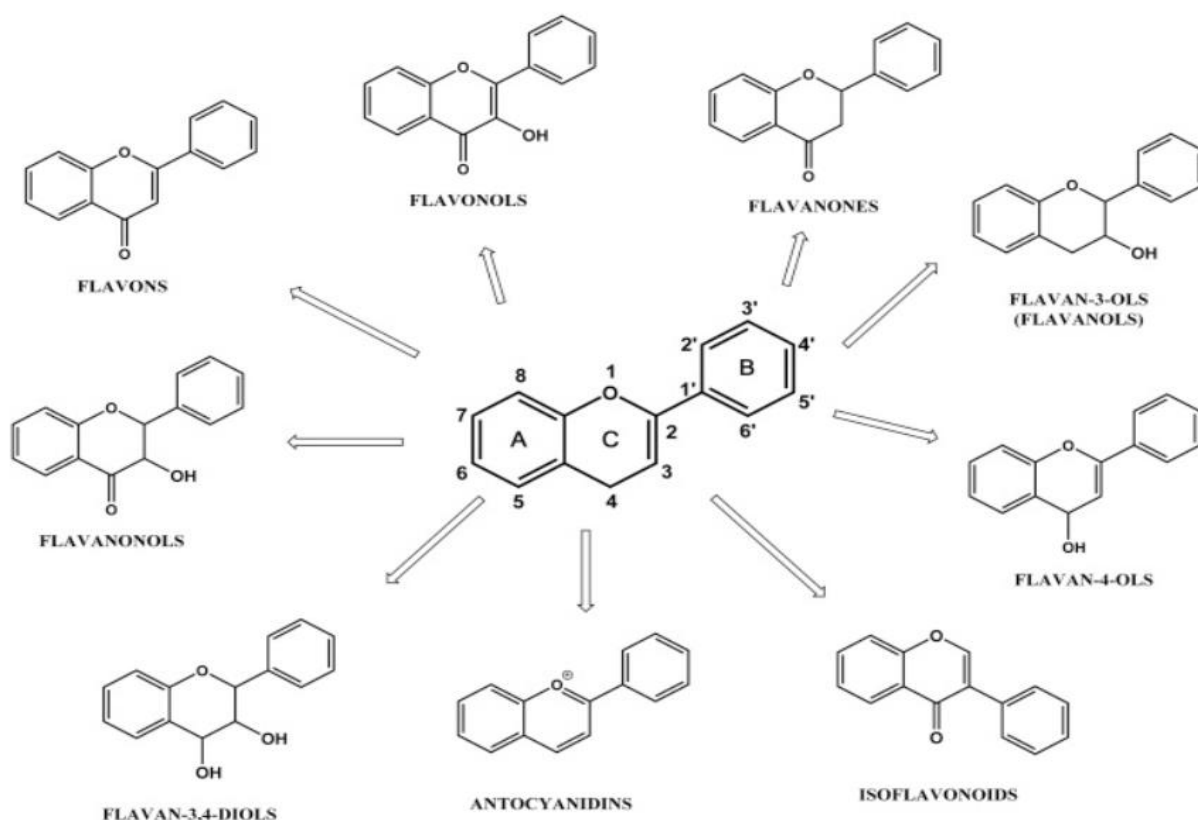
Tato skupina látek je převážně přírodního původu, vyskytují se jako sekundární metabolity rostlin. Z hlediska struktury se jedná o sloučeniny, které obsahují jedno či více benzenových jader, které jsou substituovány jednou nebo více hydroxylovými skupinami. Právě díky těmto hydroxylovým skupinám mají velkou antioxidační aktivitu (mohou poskytnout proton na zhasení volných radikálů) [33]. Rozdělení fenolických látek podle struktury jejich uhlíkového skeletu je uvedeno na obrázku (viz. Obrázek 2) [34].

Třída	Počet uhlíků	Základní struktura	Třída	Počet uhlíků	Základní struktura
Jednoduché fenoly	C ₆		Naftochinony	C ₆ -C ₄	
Benzochinony	C ₆		Xantony	C ₆ -C ₁ -C ₆	
Fenolické kyseliny	C ₆ -C ₁		Stilbeny	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Acetofenony	C ₆ -C ₂		Antrachinony	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Kyseliny fenyloctové	C ₆ -C ₂		Flavonoidy	C ₆ -C ₃ -C ₆	
Kyseliny skořicové	C ₆ -C ₃		Lignany a neolignany (C ₆ -C ₃) ₂		
Fenylpropeny	C ₆ -C ₃		Ligniny	(C ₆ -C ₃) _n	
Kumariny	C ₆ -C ₃				
Chromony	C ₆ -C ₃				

Obrázek 2: Třídy fenolických látek [34]

2.6.1.1 Flavonoidy

Jsou to sloučeniny obsahující flavonový cyklický skelet ze dvou substituovaných benzenových kruhů a jednoho pyranového kruhu, který je přímo spojen s jedním z benzenových kruhů. Právě díky různým modifikacím tohoto pyranového kruhu (například oxidací, či substitucí) se flavonoidy dále dělí na další skupiny jako flavany, flavanoly, flavony anthokyanidy atd. (viz. Obrázek 3). Flavonoidy se také dají rozlišovat podle pozice, ve které je na pyranový kruh navázán druhý benzenový kruh. Pokud je navázán v pozici 2, tak se jedná o normální flavonoidy, v pozici 4 o neoflavonoidy a pokud v pozici 3, tak jde o isoflavonoidy ze kterých lze syntetizovat insekticidy (rotenoidy) [35]



Obrázek 3: Třídy flavonoidů [36]

Velmi často se vykytují jako sekundární metabolity vyšších rostlin, například v jejich květech nebo plodech jako barviva. Mají funkci také antioxidační, působí jako velmi silné vychytávače volných radikálů. Konkrétně inhibují oxidaci nízko hustotních lipoproteinů, čímž mohou u člověka snižovat riziko vytváření aterosklerózy. Chrání také před účinky UV záření a mají antimikrobiální vlastnosti [37].

2.6.1.2 Taniny

Neboli třísloviny jsou makrosloučeniny s velkým množstvím fenolických hydroxylových skupin, které jsou schopny vytvářet vazby mezi makromolekulami jako například bílkovinami a tím je srážet. Dělí se do dvou skupin a to do hydrolizovatelných a kondenzovaných taninů neboli proanthokyanidinů.

- **Hydrolizovatelné taniny:** Působením slabých kyselin, nebo zásad se rozkládají na monosacharid a fenolkarboxylové kyseliny (například kyselinu gallovou nebo ellagovou).
- **Proanthokyanidiny:** Jsou to oligomery nebo polymery jejichž rozklad je nutno provést v zahřívaném, kyselém alkoholovém roztoku. Tento rozklad vede ke vzniku anthokyanidinů (flavonoidů), což jsou červené pigmenty.

Oba typy se běžně se vyskytují v rostlinách, ale v řasách, či houbách je jich podstatně méně. V rostlinách mají funkci ochrany proti býložravcům, protože mají velmi trpkou chuť a tím je odrazují od konzumace. Mají také antimikrobiální účinek [38].

2.6.2 Karotenoidy

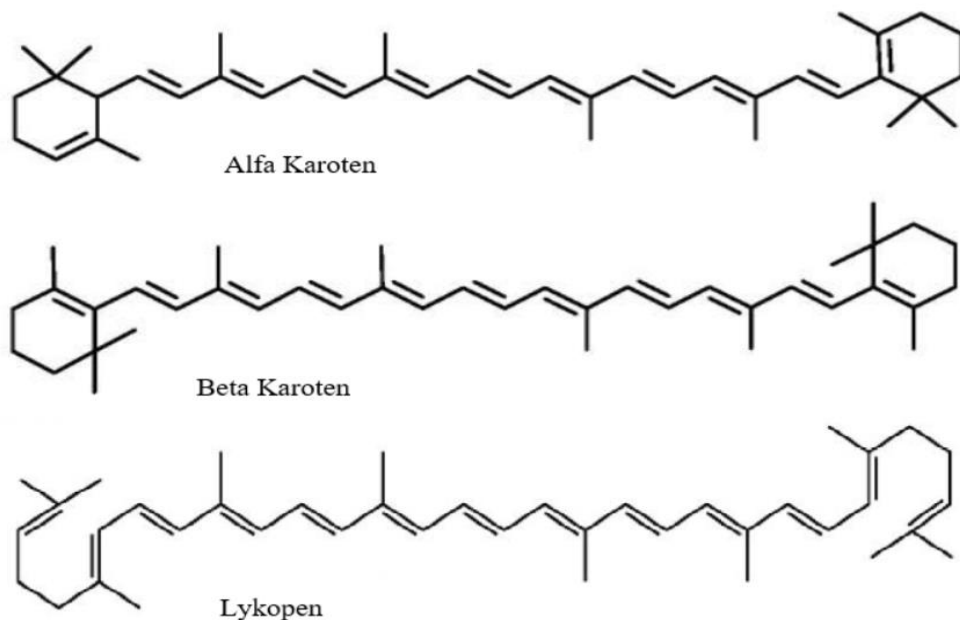
Tato skupina látek se řadí mezi terpeny, konkrétně tetraterpeny, tudíž jsou tvořeny osmi izoprenovými jednotkami (2-methylbuta-1,3-dieny). Tyto řetězce na svých koncích mohou tvořit cykly a můžeme je pak rozdělit na acyklické, monocyklické a bicyklické. Většinou se ale dělí na uhlovodíky karoteny a jejich kyslíkaté deriváty xantofyly. Obecně jsou karotenoidy látky žluté, oranžové až červené a fialové, rozpustné v tucích. V přírodě se nacházejí například v rostlinách jako sekundární barviva důležitá pro fotosyntézu, nebo v karotenogenních kvasinkách, které chrání před negativními účinky UV záření (viz. bod 2.1.2.5.). Dále jsou důležité pro zrak a jsou označovány jako vychytávače volných radikálů [37].

2.6.2.1 Karoteny

Jedná se čistě o uhlovodíky, čili nepolární a hydrofobní látky, které obsahují konjugovaný systém dvojných vazeb. Díky tomuto systému delokalizovaných elektronů jsou schopny zhaset ROS (viz. bod 2.4.1) a pohlcovat elektromagnetické záření [39].

- **Beta karoten:** Jedná se o nejrozšířenější červeno-oranžový karotenoid vyskytující se v řadě podobně zbarvených druhů rostlin, ovoce. Dále se vyskytuje v kvasinkách (viz. bod 2.1.1), či řasách (např.: *Chlorella*, *Chlamydomonas* a *Dunaliella*) [40]. Stejně tak jako alfa karoten je prekurzorem vitamínu A, neboli retinolu, který se v lidském těle dále metabolizuje na retinal. Ten je nezbytný pro správnou funkci zraku. Beta karoten má také velmi silné antioxidační účinky, konkrétně velmi účinně zhasí singletový kyslík (viz. bod 2.4.1) a jiné volné radikály [33]. Co se struktury týče, tak jde o bicyklický karotenoid (viz. Obrázek 4).

- **Lykopen:** Tento acyklický, jasně červený karotenoid je nejúčinnějším zháščem singletového kyslíku [41]. Obsahuje ho převážně zelenina jako například červená řepa, rajčata a meloun. Bylo prokázáno, že lykopen má pozitivní účinky na lipidy v lidské krvi a může tak předcházet kardiovaskulárním chorobám [42]

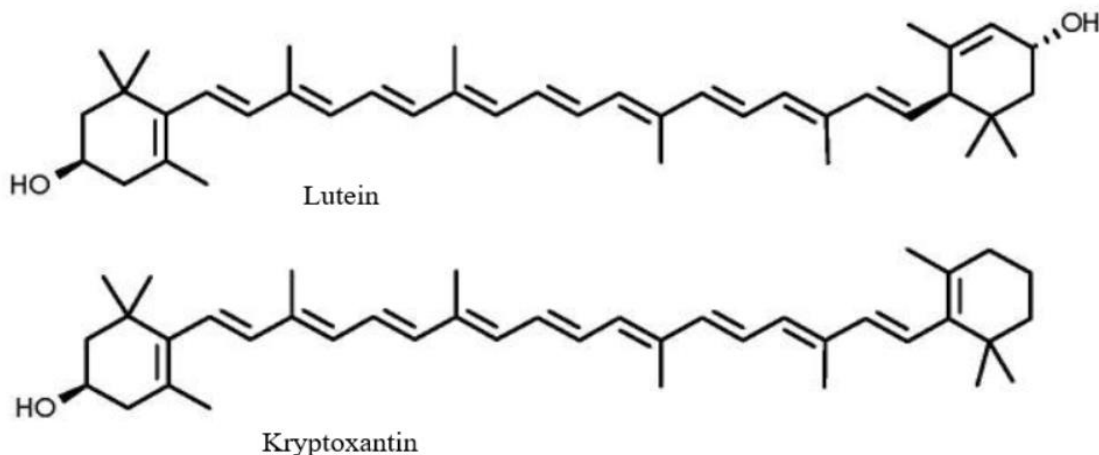


Obrázek 4: Příklady karotenů [43], [44]

2.6.2.2 Xantofyly

Xantofyly se od karotenů liší tím, že obsahují ve své struktuře kyslík. Ten zvyšuje jejich polaritu a mírně i jejich rozpustnost ve vodě [39].

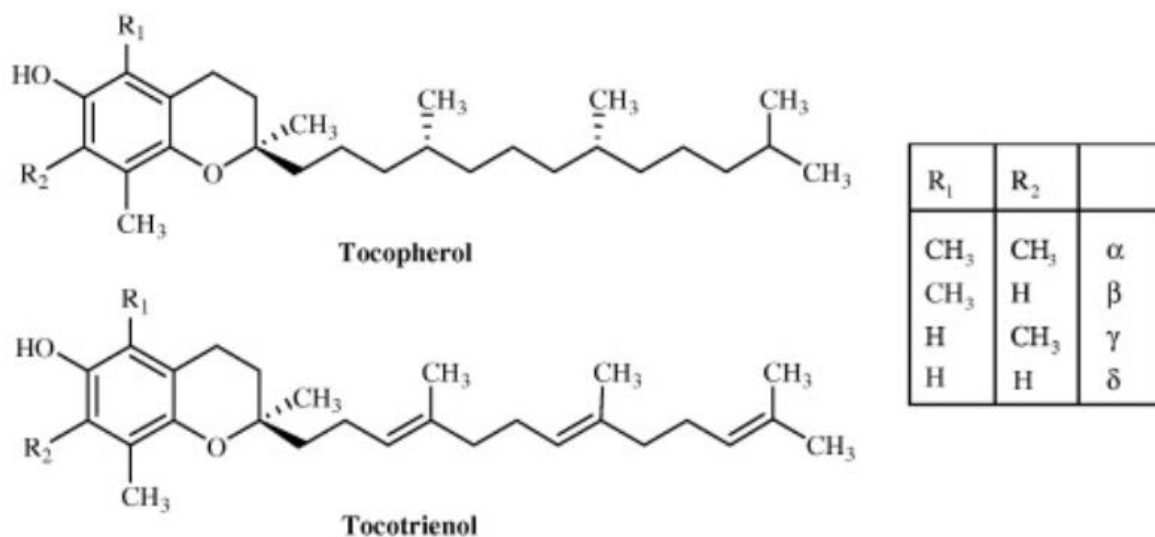
- **Lutein:** Toto žluté karotenoidní barvivo se vyskytuje například v květech pampelišek nebo slunečnic a v listech špenátu, či řasách rodu *Chlorella* nebo *Chlamydomonas*. Také se ale vyskytuje ve vaječném žloutku a v lidském oku ve žluté skvrně. Má velkou antioxidační funkci, je schopen deexcitovat excitovaný chlorofyl v rostlinách a vyzářit tuto excitační energii nesvětelnými přechody a chránit tak rostlinu před stresem z účinků slunečního záření [39]. Podobný efekt má i u člověka jako zhášec volných radikálů, chrání před šedým zákalem a zmírňuje makulární degeneraci spojenou se stárnutím [45].
- **Kryptoxantin:** Je velmi úzce spojen s beta karotenem, protože je mu strukturně velmi podobný. Jediný rozdíl mezi nimi je ten, že je na jednom jeho cyklickém konci substituována hydroxylová skupina. Z metabolického hlediska i z hlediska jeho účinku na organismus je také velmi podobný beta karotenu, je provitaminem A a má výrazné antioxidační účinky. Krom těchto účinků působí také pozitivně na metabolismus v kostní tkáni [46].



Obrázek 5: Příklady xantofylů [44]

2.6.3 Vitamín E

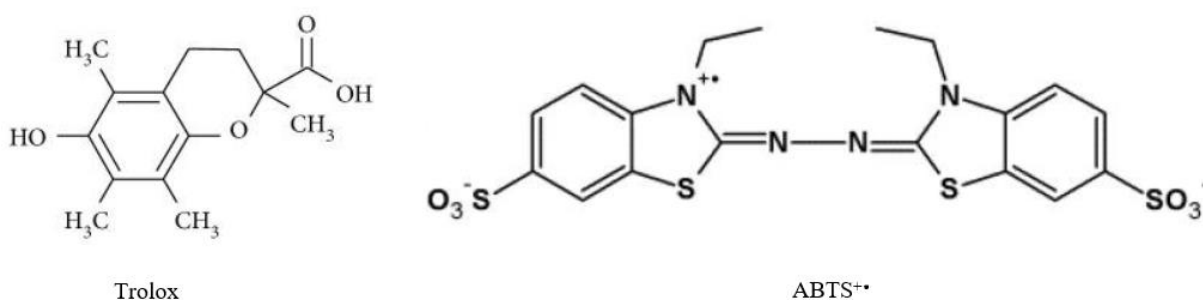
Jde o skupinu 8 látek. Konkrétně o alfa až delta tokoferoly a tokotrienoly. Jedná se o antioxidanty vychytávající volné radikály v buněčných membránách a lipoproteinech nacházejících se v plazmě, čímž zabraňují jejich oxidaci. Jelikož ovšem obsahují pouze jednu hydroxylovou skupinu (viz. Obrázek 6), tak jsou schopny najednou zhasit pouze jeden radikál. Po tom co se oxidují, svou antioxidační schopnost ztrácí. Tokotrienoly mají na rozdíl od tokoferolů svůj izoprenový postranní řetězec nenasyčený, čímž získávají o něco vyšší antioxidační aktivitu, chrání nervovou soustavu, snižují hladinu cholesterolu a snižují riziko rakoviny [47]. Vyskytují se například v zelených mikrořasách rodu *Chlorella* a *Spirulina* [48].



Obrázek 6: Struktura vitamínů E [47]

2.7 Antioxidační aktivita

Je to míra schopnosti dané látky zhášet volné radikály (neboli míra antioxidačního účinku). Často se určuje v jednotkách TEAC neboli trolox equivalent antioxidant capacity, existují ovšem i další. TEAC porovnává antioxidační účinek určité koncentrace modelového antioxidantu troloxu a vzorku. Vše je založeno na zhášení radikál kationu $\text{ABTS}^{+\bullet}$, který se připravuje předem, rozpuštěním v ethanolu s peroxodisíranem draselným na přesné koncentrace obou látek. Roztok kation radikálu $\text{ABTS}^{+\bullet}$ je chromofor zbarvený do zeleno–modra. Přidáním roztoku antioxidantu se odbarvuje a tento pokles absorbance se pak měří. Této metody se využívá při měření celkové antioxidační aktivity jak hydrofilních, tak lipofilních antioxidantů [49].



Obrázek 7: Struktura Troloxu [50] a radikál kationu ABTS [51]

2.8 Toxicita

Toxicita je schopnost látek poškozovat živé organismy. Sice se dá říct, že každá látka je toxická a jen záleží na dávce (koncentraci), ale u některých látek by dávka, která by byla pro daný organismus již toxická byla tak obrovská, že nejsou považovány za toxické, protože ani není možné dosáhnout takové koncentrace dané látky v organismu. Zavádí se stupnice LC neboli letální (smrtelné) koncentrace nebo stupnice LD (letální dávka), když se zkoumá účinek dané látky na kupříkladu populaci myší. Většinou se určuje koncentrace LC_{50} , což je koncentrace dané látky, která je schopna usmrtit 50 % populace buněk, popřípadě LD_{50} (dávka která usmrtila 50 % populace jedinců). Také je možno určovat koncentraci IC_{50} . Ta vyjadřuje koncentraci dané látky (enzymového jedu) která způsobí inhibici 50 % přítomných enzymů. Čím je daná látka toxičtější, tím nižší je hodnota $\text{LC}_{50}/\text{LD}_{50}$ nebo IC_{50} . Toxicitu lze také vyjádřit *dose–response* křivkou jako funkci závislosti přežívší populace na koncentraci dané toxické látky, tímto se získá hyperbola. Když ovšem namísto hodnoty koncentrace toxické látky dosadíme do grafu přirozený logaritmus této hodnoty, tak získáme sigmoidní křivku z jejíhož inflexního bodu můžeme určit hodnotu $\text{LC}_{50}/\text{LD}_{50}$ nebo IC_{50} [52].

2.8.1 Cytotoxicita

Cytotoxicita je toxicita vztažená na buňky. Buňka při kontaktu s cytotoxickou látkou může reagovat různými způsoby. Může dojít k apoptóze, což je sebedestrukce buňky (buněčná smrt), kterou buňka zahájí, pokud v ní dojde k nějakému abnormálnímu jevu, například k nevratné mutaci DNA. Pokud to z nějakého důvodu neučiní, vede to ke vzniku rakoviny. Může také dojít k nekróze, což je doslova smrt buňky způsobená extrémními podmínkami, nebo přítomností látky která nevratně poškozuje buněčnou membránu nebo některé esenciální orgány buňky [53].

2.8.1.1 Měření cytotoxicity

Cytotoxicita se nejčastěji měří kolorimetricky, což je optická metoda, při níž se pomocí spektrofotometru měří absorbance buněk nebo jejich částí, ke kterým je přidáno specifické barvivo. Toto měření se obvykle provádí v destičkách s jamkami, které jsou vyhodnocovány pomocí ELISA readeru [53]. Je také možné živé a mrtvé buňky přímo počítat pod mikroskopem při určitém zvětšení v Bürkerově počítací komůrce [54].

2.8.1.2 Test trypanovou modří

Při tomto testu lze snadno poznat, jestli jsou buňky živé nebo mrtvé. Využívá se toho, že trypanová modř barví pouze orgány buněk s porušenou buněčnou membránou, tudíž mrtvých nebo poškozených. Nikdy nebarví orgány živých buněk. Poškozené nebo mrtvé, zbarvené a živé, nezbarvené buňky se poté počítají v Bürkerově počítací komůrce pod mikroskopem při určitém zvětšení [54].

2.8.1.3 MTT test

MTT neboli 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid je ve vodě rozpustná sloučenina tetrazoliové soli. Po přidání k buňkám je MTT redukován v mitochondriích živých buněk na fialovo-modrý formazan, který je nerozpustný ve vodě. Tyto krystalky formazanu se pak rozpustí vhodným rozpouštědlem a může se provádět spektrofotometrické měření. Ve výsledku hodnota absorbance udává procento živých buněk, čím vyšší je, tím vyšší je procento živých buněk. Tento test je velice oblíbený především díky své nenáročnosti [55].

2.9 UV záření

Jedná se o elektromagnetické záření s menší vlnovou délkou než jakou má viditelné světlo, čili menší než 400 nm. Dělí se na UVC, UVB a UVA záření, přičemž UVC má nejkratší vlnovou délku a tudíž nejvyšší energii. V přírodě je zdrojem UV záření Slunce, ale je generováno i uměle například za účelem sterilizace nástrojů, či prostor a nebo v soláriích za účelem umělého opálení [56]. Na zemský povrch ovšem přirozeně nedopadá UVC záření a ani většina UVB záření, protože jsou absorbovány ozónem, kyslíkem a vodní parou v atmosféře (ovšem pouze za předpokladu, že ozónová vrstva není narušena). Naopak UVA a malá část UVB záření na zemský povrch dopadají. Ve vyšších dávkách tyto záření pak způsobují zvýšenou tvorbu volných radikálů v kůži a v důsledku její vrásky a stárnutí nebo spálení (erytém) [57]. Oba typy záření mohou mít negativní vliv i na oči (např. tvorba kataraktu) a při zvýšených, chronických dávkách mohou vést až ke tvorbě rakoviny kůže (např. melanomu) v důsledku poškození DNA kožních buněk [56]. UV záření má ovšem i pozitivní účinek, konkrétně při ozáření kůže UVB zářením dochází k tvorbě vitamínu D, který je důležitý pro správný růst kostí a zubů, dále hraje podstatnou roli v normální funkci štítné žlázy, reguluje imunitní systém, působí proti tvorbě nádorů a má i řadu dalších funkcí. Jeho nedostatek pak vede k řadě autoimunitních, onkologických a dalších onemocnění [58].

- **UVC oblast:** Označuje se tak záření vlnové délky od 100 do 280 nm. Je rozptylováno v ionosféře a pohlcováno ozónem, k jehož tvorbě ve stratosféře taky významně přispívá [56]. Označuje se taky někdy jako germicidní, protože hubí mikroorganismy a využívá se k dezinfekci [59].
- **UVB oblast:** Obsahuje vlnové délky od 280 do 320 nm. Na zemský povrch dopadá 1–10 % z celkového objemu UVB záření přicházejícího k Zemi. UVB záření se také využívá ke sterilizaci, ale pouze jako doplňková dezinfekční metoda. Je silně baktericidní, jelikož v buňkách bakterií tvoří toxický peroxid vodíku, ale jeho účinnost se vzdáleností od zářiče rychle klesá [56].
- **UVA oblast:** Nachází se v intervalu vlnových délek od 320 do 400 nm. Na zemský povrch běžně dopadá. Využívá se například v soláriích nebo v terapeutických zářičích při léčbě lupénky [56].

2.10 Chemické UV filtry

Jsou to organické látky obsahující alespoň jedno aromatické benzenové jádro, nebo jiný systém násobných vazeb obsahující delokalizované π elektrony absorbující energii záření o vlnových délkách UVA nebo UVB oblasti. Tím zabráňují tvorbě volných radikálů, které by mohly vznikat jeho působením. Proto se hojně využívají například v opalovacích krémech. Příkladem těchto látek mohou být polyfenoly a další antioxidanty (viz. bod 2.6) [60] nebo i jiné organické (syntetické) sloučeniny jako například benzofenony, nebo salicyláty a další. Ideální UV filtr by měl absorbovat obě UVA i UVB záření pomocí excitace π elektronů vyskytujících se v konjugovaném systému dvojných vazeb, být netoxický, stabilní během expozice UV záření a nerozkládat se na případně toxické produkty. Reálné UV filtry ovšem podléhají fotolýze, jelikož energie záření, kterou absorbují se nepřeměňuje na jinou formu dostatečně rychle a v excitovaném stavu může molekula UV filtru reagovat například s chlórem v bazénech, či moři. Ukazuje se, že produkty těchto reakcí bývají toxické a mají nepříznivý vliv například na ryby, jelikož se z pokožky lehce smývají do vody, takže se tyto UV filtry ukazují být jako významné polutanty životního prostředí [61]. Například benzofenon a ethylhexylsalicylát (běžně používané UV filtry v opalovacích krémech) už při nízkých koncentracích způsobují i vybělování korálů tím, že indukují zahájení lytického cyklu latentních virů v symbiotických řasách korálů [62]. Proto by UV filtry ve formě antioxidantů vyextrahovaných z přírodních zdrojů mohly být vhodnou náhradou těchto syntetických UV filtrů, jelikož se jedná o přírodní látky, které jsou biodegradabilní.

2.11 SPF

Neboli *Sun protection factor* je faktor charakterizující efektivitu UV filtru v UVB oblasti. Dá se vyjádřit jako poměr minimální energie UV záření vyvolávající erytém u pokožky chráněné UV filtrem a u pokožky bez ochrany. In vitro se SPF stanovuje pomocí měření absorbancí v rozmezí od 290 do 320 nm s krokem po 5 nm [63]. Tyto naměřené hodnoty absorbancí se následně dosazují do Mansurovy rovnice, Rovnice (1), podle které je možno vypočíst SPF.

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times A(\lambda) \quad (1)$$

Kde CF je korekční faktor (roven 10), $EE(\lambda)$ je erytemogenní efekt záření o vlnové délce λ , $I(\lambda)$ je intenzita solární radiace při vlnové délce λ a $A(\lambda)$ je absorbance vzorku při vlnové délce λ . Hodnoty $EE \times I$ jsou konstanty pro každou vlnovou délku, viz. Tabulka 1 [64].

Tabulka 1: Hodnoty konstant $EE \times I$ pro jednotlivé vlnové délky [64]

Vln. Délka	290	295	300	305	310	315	320
$EE \times I$	0.015	0.0817	0.2874	0.3278	0.1864	0.0837	0.0180

3 Cíl práce

Cílem této práce byla extrakce aktivních látek z biomasy karotenogenních kvasinek a mikrořas a následná charakterizace těchto extraktů. V rámci této bakalářské práce byly řešeny následující dílčí cíle:

- Literární rešerše.
- Optimalizace extrakcí aktivních látek z mikrořas a karotenogenních kvasinek.
- Stanovení koncentrace aktivních látek, celkové antioxidační aktivity a SPF extraktů pomocí UV–VIS spektrofotometrie.
- Určení cytotoxického účinku vybraných extraktů na lidské kožní buňky linie HaCaT.
- Vyhodnocení výsledků a diskuze.

4 Experimentální část

4.1 Použité mikroorganismy

- *Chlorella sorokiniana*, kultivovaná na FCH VUT
- *Chlorella Vulgaris*, Empower supplenents (Čína)
- *Cystofilobasidium Macerans*, kultivované na FCH VUT, zdroj dusíku síran amonný, zdroj uhlíku glycerol, C/N = 13 (pro produkci karotenoidů)
- *Scenedesmus dimorphus*, kultivovaná na FCH VUT
- *Spirulina sp.*, Empower supplenents (Čína)

4.2 Použité lidské buňky

- HaCaT, Lidské keratinocyty pocházející z 62letého dárce mužského pohlaví eurasijského původu. Získány od CLS (Eppelheim, Německo)

4.3 Použité chemikálie a materiál

- ABTS HPLC ≥ 98 %, Sigma Aldrich (Německo)
- Aceton p.a., Penta (ČR)
- Chlorid hlinitý p.a., Lach–Ner (ČR)
- Chloroform stabilizovaný 1 % Ethanolu p.a., Penta (ČR)
- DME/High Glucose (1X), HyClone (USA)
- DMSO p.a., Lach–Ner (ČR)
- Dodecylsíran sodný, Serva (Německo)
- Dusitan sodný p.a., Lach–Ner (ČR)
- Ethanol, 96 % p.a., Penta (ČR)
- Ethanol 96 % pro UV–VIS, Penta (ČR)
- Folin–Ciocalteuovo činidlo p.a., Penta (ČR)
- Hexan, p.a., Lach–Ner (ČR)
- Hydroxid sodný p.a., Lach–Ner (ČR)
- Katechin, Sigma Aldrich (Německo)
- Kyselina gallová, Sigma Aldrich (Německo)
- Methanol p.a., Penta (ČR)
- MTT, Duchefa Biochemie (Nizozemsko)
- Peroxodisíran draselný, Sigma Aldrich (Německo)
- Skleněné kuličky 0,25–0,5 mm, Carl Roth (Německo)
- Trolox, Sigma Aldrich (Německo)
- Trypsin Versene EDTA, P-Lab (ČR)
- Uhličitan sodný p.a., Lach–Ner (ČR)

4.4 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy GH–202, A&D Europe (Německo)
- Automatický vortex, Vortex genie 2, Scientific industries (USA)
- Box ochranný laminární, Airstream ESCO Class II BSC (Německo)
- CellCulture CO₂ Inkubátor, ESCO (Německo)
- Centrifuga U–32R, BOECO (Německo)
- Centrifuga Z 36 HK, Hermle Labortechnik (Německo)
- Centrifuga Minispin®, Eppendorf (Německo)
- ELISA Reader Synergy HTX, BioTek (Německo)
- Inverzní biologický mikroskop I-101 L-Scientific, Laboserv (ČR)
- Nanodrop Spektrofotometr N50, Implen (Německo)
- NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH (Německo)
- Ruční vortex, Fixed speed vortex, Ohaus corporation (USA)
- Sonikátor, Bandelin sonorex (Německo)
- Soxtherm extraktor SOX 412, Gerhardt (Německo)
- Třepačka, Heindolph unimax 1010, Heindolph instruments (Německo)
- Vakuová rotační odparka RV 06–ML, IKA-Werke (Německo)

4.5 Optimalizace extrakcí z mikrořas

4.5.1 Extrakce do vody a ethanolu

Do plastových zkumavek byl navážen 1 g vzorku řasy a zalit 10 ml koncentrační řady ethanolu ve vodě. Tato suspenze byla ponechána na třepačce se extrahovat po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby byly zkumavky zcentrifugovány (6 000 RPM, 5 minut) a supernatant odpipetován do jiných čistých zkumavek. Tyto zkumavky pak byly uchovávány ve tmě při 5 °C. Lze je vidět na obrázku (viz. Obrázek 11).

4.5.2 Extrakce do hexanu

Do papírových patron pro přístroj Soxtherm bylo naváženo 10 g vzorku řasy a byly umístěny do skleněných nádob určených pro tuto extrakci (viz. Obrázek 8). Tyto patrony byly následně zality 100 ml hexanu a vloženy do přístroje. Následně byl přes počítač spuštěn program na extrakci hexanem s extrakční teplotou při 170 °C a vzorky byly ponechány extrahovat se po dobu 3,5 hodiny. Tyto extrakty byly přelity do slzičkových baněk a byl z nich odpařen hexan pomocí vakuové rotační odparky. Vytvořený film extraktů na stěnách baněk byl kvantitativně převeden do lahvíček pomocí 5 ml 96% ethanolu, ve kterém zůstal rozpuštěn. Víko lahvíček bylo utěsněno parafinovým filmem a lahvičky pak byly uchovávány ve tmě při teplotě –16 °C. Vzhled konečných extraktů lze vidět na obrázku v bodě 5.1.1.1 (viz. Obrázek 11).



Obrázek 8: Přístroj Soxtherm a pro něj určená skleněná nádoba s papírovou patronou

4.6 Optimalizace extrakcí z karotenogenních kvasinek

Pro každou extrakci byl připraven vzorek tak, že byl do zkumavky navážen 1 g lyofilizované kultury karotenogenních kvasinek, který byl následně ponechán rehydratovat po dobu 1 hodiny a následně přes noc pomalu zamražen za účelem narušení buněčné membrány. Nakonec byl vzorek rozmražen, odstředěn, přebytečná voda nad sedimentem odpipetována pryč a se sedimentem se pracovalo dále podle následujících bodů. Jako inspirace pro použitá rozpouštědla a postupy sloužil článek od Rameshe Kumara Saini a Young-Soo Keum [65].

4.6.1 Hexan

Ke vzorku bylo po přípravě přilito 40 ml hexanu a byly přidány 2–3 lžičky skleněných kuliček o průměru 0,25–0,5 mm, které měly pomoci narušit jednotlivé buňky kvasinek. Tato směs byla za současného chlazení sonikována pomocí sonikátoru se sondou po dobu 10 minut programem bez pulzů s 50% amplitudou. Dále byl vzorek ponechán promíchávat se na vortexu po dobu 30 minut. Nakonec byla tato směs zcentrifugována (6 000 RPM, 5 minut). Došlo k vytvoření sedimentu kvasinkové biomasy a čirého hexanového supernatantu s extraktem. Ten byl odpipetován a hexan byl odpařen pomocí vakuové rotační odparky a film extraktů rozpuštěn v 8 ml 96% ethanolu. Nakonec byl uchován ve tmě při $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další charakterizaci.

4.6.2 Hexan a DMSO

Připravený vzorek byl zalit 10 ml DMSO a byly přidány skleněné kuličky. Vzorek bylo nutné při přidávání DMSO chladit, aby nedošlo k degradaci karotenoidů, protože se po přidavku DMSO poměrně dost zahříval. Pak byla tato směs promíchána 2–3 minuty na ručním vortexu. Po promíchání byla tato směs zalita 30 ml hexanu a bylo postupováno jako v předchozím bodě. Po centrifugaci došlo k vytvoření dvou fází, z nichž byla odpipetována horní hexanová fáze s extraktem se kterou se pak také postupovalo stejně jako v předchozím bodě.

4.6.3 Hexan a ethanol

Vzorek kvasinek byl zalit 40 ml směsí hexanu a 96% ethanolu v poměru 1:1. Pak byly přidány skleněné kuličky a pracovalo se s touto směsí stejně jako v předchozím bodě. Po centrifugaci byl odpipetován supernatant s extraktem (hexan a ethanol jsou mísitelná rozpouštědla), vzorek byl následně odpařen a uchováván stejně jako předchozí extrakty.

4.6.4 Extrakce dle Folche

Ke vzorku kvasinek byla přidána směs chloroformu a methanolu v poměru 2:1 [66] o objemu 30 ml a skleněné kuličky. Potom byla tato směs ponechána sonikovat a vortexovat stejně jako předchozí vzorky. Nakonec bylo přidáno 10 ml vody na promytí extraktu, promícháno a odstředěno. Po rozdělení fází byla odpipetována spodní chloroformová fáze s extraktem, odpařena a uchovávána jako předchozí extrakty.

4.6.5 Hexan a aceton

K připravenému vzorku kvasinek bylo přidáno 40 ml hexanu a acetonu v poměru 7:3. Pak byly přidány skleněné kuličky. Tato směs pak byla extrahována, odpařena a uchovávána stejným způsobem jako ty předešlé.

4.6.6 Ethanol

Ke vzorku byly při první extrakci přidány skleněné kuličky a 40 ml 96% ethanolu. Vzorek byl pak ponechán sonikovat a vortexovat. Pak byla tato směs odstředěna a ethanolový supernatant s extraktem byl odpipetován do čisté zkumavky, která byla uchovávána jako předchozí extrakty. K sedimentu bylo pro druhou extrakci přidáno dalších 40 ml 96% ethanolu a vzorek byl umístěn na 24 hodin na třepačku. Po uplynutí této doby byl vzorek odstředěn a tento supernatant byl spojen s prvním, zakoncentrován do 8 ml ethanolu pomocí vakuové rotační odparky a uchováván jako předchozí vzorky.

4.6.7 Ethanol a DMSO

Ke kvasinkám zbavených vody bylo přidáváno 30 ml 96% ethanolu a 10 ml DMSO. Další postup byl totožný s bodem 4.6.6.

4.6.7.1 *Odstranění DMSO z Ethanolových extraktů*

Odstranění DMSO bylo docíleno odpařením ethanolu na vakuové rotační odparce. Po odpaření ethanolu zbyl v baňce na její stěně film extraktů a na dně menší objem DMSO, ve kterém zůstala rozpuštěna část extraktů. Do baňky byl přidán hexan a tato směs byla převedena do zkumavky. Baňka byla vyplachována hexanem do zkumavky, dokud nebylo docíleno kvantitativního převedení extraktu. Extrakt byl následně vytřepáván do hexanové fáze a ta byla odpipetována zpět do slizčkové baňky, dokud odpipetovávaná hexanová fáze nebyla bezbarvá. Hexan byl pak odpařen pomocí vakuové rotační odparky a film extraktu byl rozpuštěn v 8 ml 96% ethanolu a uchováván s ostatními extrakty.

4.6.8 Methanol, hexan a aceton

K připravenému vzorku bylo přidáno 15 ml methanolu a skleněné kuličky. Tato směs byla ponechána 10 minut sonikovat a následně umístěna na 30 minut do vortexu. Poté byla zcentrifugována a byl získán supernatant č.1. K sedimentu bylo přidáno 10 ml směsi hexanu s acetonem v poměru 1:1 a opět ponecháno 30 minut vortexovat. Pak byl tento vzorek opět zcentrifugován a tak byl získán supernatant č.2. Oba supernatanty byly spojeny a bylo k nim přidáno 20 ml hexanu. Tato směs byla ponechána 10 minut promíchávat na vortexu za účelem extrakce karotenoidů do hexanové fáze. Pak byl extrakt promyt 5 ml roztoku chloridu sodného a vzorek byl ponechán stát do úplné separace fází. Hexanová fáze s extraktem byla odpipetována a extrakce byla opakována s dalšími 20 ml hexanu, dokud odpipetovaný hexan nebyl bezbarvý. Celý objem hexanových extraktů byl pipetován do slzičkových baněk, ze kterých byl pak hexan odpařen pomocí rotační vakuové odparky. Film vyextrahovaných látek byl následně rozpuštěn v 8 ml 96% ethanolu a uchováván s předchozími extrakty.

4.6.9 Methanol, DMSO, hexan a aceton

Při této extrakci bylo postupováno stejně jako v bodě 4.6.8, jen s tím rozdílem, že místo 15 ml methanolu byl vzorek zalit směsí 10 ml methanolu a 5 ml DMSO. Tato extrakce a extrakce v předešlém bodě byly převzaty od Biehlera Erica et al. [67] a částečně upraveny.

4.7 Charakterizace extraktů

4.7.1 Celková výtěžnost extraktů

Z každého extraktu z mikrořas byl odpipetován přesný objem do předem zvážených zkumavek eppendorf. Tyto zkumavky byly pak v držáku umístěny do digestoře a v ní byly ponechány odpařit ve tmě. Po odpaření veškerého rozpouštědla byly tyto zkumavky znovu zváženy a byla zjištěna celková hmotnostní koncentrace všech vyextrahovaných látek.

Extrakty z karotenogenních kvasinek byly všechny odpařovány na vakuové rotační odparce, čehož bylo využito k zjištění jejich celkové hmotnostní koncentrace. Slzičkové baňky byly před použitím pečlivě vysušeny v sušárně a následně umístěny do exsikátoru, dokud nevychladly. Poté byly zváženy na analytických vahách. Po odpaření rozpouštědel byly baňky s čistým filmem extraktů znovu zváženy a až pak byl extrakt rozpuštěn v definovaném objemu rozpouštědla.

4.7.2 Stanovení celkových fenolických látek

K 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla naředěnému v poměru 1:9 s vodou byl přidán další 1 ml vody a 50 μ l vzorku. Ihned poté byl vzorek promíchán na vortexu a ponechán stát po dobu 5 minut. Po uplynutí této doby byl přidán 1 ml nasyceného Na_2CO_3 a vzorek byl opět promíchán na vortexu a ponechán stát 15 minut. Jako finální krok byla měřena absorbance vzorku při 750 nm. Jako blank byl použit roztok se stejným postupem, jen místo vzorku bylo přidáno 50 μ l vody. Koncentrace polyfenolů byla stanovena pomocí kalibrační křivky kyseliny gallové v koncentračním rozmezí 0,087 5–0,700 0 mg/ml ve vodě viz. Rovnice (2) a (3).

$$A = 1,324\ 7 \cdot c \quad (2)$$

$$R^2 = 0,981\ 3 \quad (3)$$

4.7.3 Stanovení flavonoidů

K 0,5 ml vzorku bylo přidáno 1,5 ml vody a 0,2 ml 5% roztoku NaNO_2 , vzorek byl promíchán a ponechán 5 minut stát. Poté bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku AlCl_3 , opět bylo promícháno a ponecháno stát dalších 5 minut. Pak bylo přidáno 1,5 ml 1 mol/l roztoku NaOH a 1 ml vody, promícháno a ponecháno stát 15 minut. Nakonec byla měřena absorbance při 510 nm oproti blanku stejného složení, jen místo vzorku bylo přidáno 0,5 ml vody. Koncentrace flavonoidů byla stanovena pomocí kalibrační křivky katechinu rozpuštěného v 96% ethanolu v koncentračním rozmezí 0,06–0,30 mg/ml viz. Rovnice (4) a (5).

$$A = 3,010\ 9 \cdot c \quad (4)$$

$$R^2 = 0,996\ 6 \quad (5)$$

4.7.4 Stanovení antioxidační aktivity

ABTS bylo rozpuštěno v destilované vodě na koncentraci 7 mmol/l, společně s ABTS byl v destilované vodě rozpuštěn i $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ na koncentraci 2,45 mmol/l. Tato směs byla promíchána a ponechána reagovat 12 hodin ve tmě, což vytvořilo roztok radikál kationu $\text{ABTS}^{+\cdot}$. Tento zásobní roztok byl před použitím zředěn ethanolem pro UV-VIS na absorbanci $0,70 \pm 0,02$ při 734 nm, přičemž jako blank byl použit ethanol pro UV-VIS. Z takto naředěného zásobního roztoku byl pipetován 1 ml do zúžené kyvety, k němu přidáno 10 μ l vody a byla ihned změřena absorbance při 734 nm oproti ethanolu pro UV-VIS, což poskytlo absorbanci A_0 . Následně byl napipetován do zkumavky eppendorf další 1 ml naředěného roztoku $\text{ABTS}^{+\cdot}$ a 10 μ l vzorku. Tato směs byla promíchána a ponechána 10 minut stát ve tmě. Po uplynutí této doby byla tato směs přelita do zúžené kyvety a byla změřena její absorbance A_{10} při 734 nm. Pokles absorbance se vypočetl z rozdílu A_0 a A_{10} . Celková antioxidační aktivita byla vypočtena dosazením poklesu absorbance do kalibrační křivky antioxidační křivky troloxu v koncentračním rozmezí 0,025–0,4 mg/ml viz. Rovnice (6) a (7). Trolox byl jako modelový antioxidant rozpuštěn v 60% ethanolu pro UV-VIS na předem definované koncentrace a proměřen stejným způsobem jako vzorky.

$$A = 1,3103 \cdot c \quad (6)$$

$$R^2 = 0,9918 \quad (7)$$

4.8 Měření absorpčního spektra extraktů pomocí UV-VIS spektrofotometrie

Vzorky byly naředěny ethanolem pro UV-VIS na celkovou koncentraci všech vyextrahovaných látek 200 µg/ml, při které se následně měřilo absorpční spektrum vzorků v intervalu 200–800 nm.

4.8.1 Výpočet SPF

Pro výpočet SPF bylo využito metody uvedené v bodě 2.11. Byly použity hodnoty absorbance vzorků v rozmezí 290–320 nm s krokem 5 nm. Tyto hodnoty byly následně dosazeny do rovnice uvedené v bodě 2.11 a byl vypočten SPF.

4.8.2 Stanovení celkových karotenoidů a chlorofylů v extraktech z mikrořas

Koncentrace chlorofylu a byla vypočtena z Rovnice (8), chlorofylu b z Rovnice (9) a celkových karotenoidů z Rovnice (10). Tyto rovnice byly převzaty od Lichtenthalera Hartmuta et al. [68]. Pro výpočet byly použity hodnoty absorbancí při 470, 649 a 664 nm a muselo být zohledněno ředění.

$$c_a = (13,36 \cdot A_{664} - 5,19 \cdot A_{649}) \text{ µg/ml} \quad (8)$$

$$c_b = (27,43 \cdot A_{649} - 8,12 \cdot A_{664}) \text{ µg/ml} \quad (9)$$

$$c_{\text{kar.}} = (1000 \cdot A_{470} - 2,13 \cdot c_a - 97,64 \cdot c_b) \text{ µg/ml} \quad (10)$$

Takto vypočtené koncentrace byly následně přepočteny na koncentrace vyextrahovaných látek v mg na g navážky řasy.

4.8.3 Stanovení celkových karotenoidů v extraktech z karotenogenních kvasinek

Byly použity hodnoty absorbancí vzorků při 474 nm. Koncentrace celkových karotenoidů v kvasinkových extraktech byla vypočtena podle Rovnice (11) převzaté od Martinéze Juana et al. [69].

$$c_{\text{kar.}} = \left(\frac{A_{474} \cdot 10}{\varepsilon} \right) \text{ mg/ml} \quad (11)$$

Kde ε je molární extinkční koeficient beta karotenu v ethanolu roven 2592. Opět muselo být zohledněno ředění a následný přepočet na koncentraci v mg vyextrahovaných karotenoidů na g navážky kvasinek.

4.9 Test cytotoxicity

4.9.1 Kultivace lidských keratinocytů

Keratinocyty byly kultivovány v kultivačním médiu DME/High Glucose. Toto médium s buňkami v inkubačních lahvích bylo uchovááno v inkubátoru při teplotě 37 °C, jinak by mohlo dojít k teplotnímu šoku a buňky by mohly uhynout. Dále inkubátor zajišťoval další parametry potřebné pro správnou kultivaci (viz. bod 2.3.4). Stav buněk byl monitorován pomocí inverzního optického mikroskopu. Práce s buňkami probíhala sterilně, aby nedošlo ke kontaminaci, proto byl používán 70% ethanol pro čištění povrchů i rukou v rukavicích a s buňkami se pracovalo ve sterilním boxu.

4.9.2 MTT test

Pro měření cytotoxicity na lidských buňkách linie HaCaT byly nejdříve tyto buňky nakultivovány v 96-jamkových destičkách pro ELISA reader.

Do každé jamky bylo napipetováno 0,1 ml předem nakultivované a vhodně naředěné buněčné kultury pro získání hustoty $2-5 \cdot 10^5$ buněk na 1 ml. Destička byla s kultivačním médiem vložena do inkubátoru na 24 hodin,

Pro měření cytotoxicity byly využity vodné extrakty řasy *Chlorella Vulgaris* a *Spirulina sp.* Byla připravena koncentrační řada těchto extraktů v kultivačním médiu od 0 do 28 obj. % s krokem po 4 %. Tyto extrakty pak byly pipetovány po 100 μ l k nakultivovaným buňkám v triplicátech.

Ke krajním buňkám se na levé straně destičky se pipetovalo jen kultivační médium, tyto jamky pak sloužily jako blank neboli „cell control“ (CC). Také se k buňkám na opačném kraji destičky pipetoval roztok kultivačního média ve sterilní destilované vodě, tyto jamky byly využity jako „vehicle control“ (VC). Pokud byl test proveden správně tak by oba tyto typy jamek měly být po skončení testu velmi fialové, protože buňky by v nich neměly umírat a měly by vyprodukovat maximální možné množství fialového formazanu (viz. bod 2.8.1.3). Do dalších 3 krajních jamek s buňkami se pipetovalo ještě kultivační médium se 40% ethanolem, který by měl buňky zahubit a tyto jamky pak sloužily jako pozitivní kontrola s nízkou absorbancí. Po dokončení pipetování byla destička vložena do inkubátoru a ponechána v něm 24 hodin inkubovat.

Po uplynutí této doby bylo do každé jamky s buňkami přidáno 20 μ l sterilního roztoku MTT ve fosfátovém pufru o koncentraci 2,5 mg/ml. A destička byla opět umístěna do inkubátoru tentokrát na dobu 3 hodin.

Po inkubaci bylo do každé jamky napipetováno 100 μ l 10% roztoku SDS ve fosfátovém pufru a destička byla ponechána na tmavém místě při laboratorní teplotě 24 hodin. Pak byla změřena absorbance jednotlivých jamek při vlnové délce 543 nm pomocí ELISA readeru. Tyto absorbance byly poděleny absorbancemi jamek označených jako CC a tyto výsledné poměry pak udávaly viabilitu buněk, která pak byla vynesena do grafů v procentech.

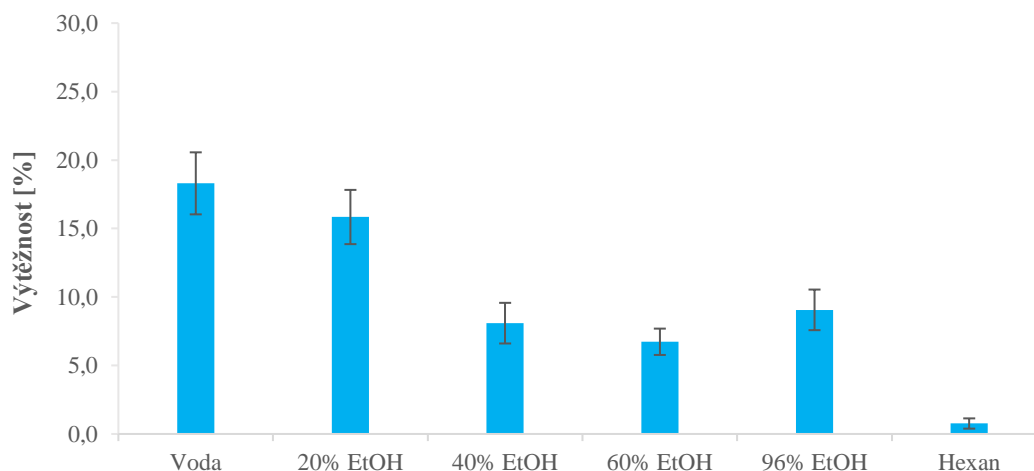
5 Výsledky a diskuze

5.1 Extrakty z mikrořas

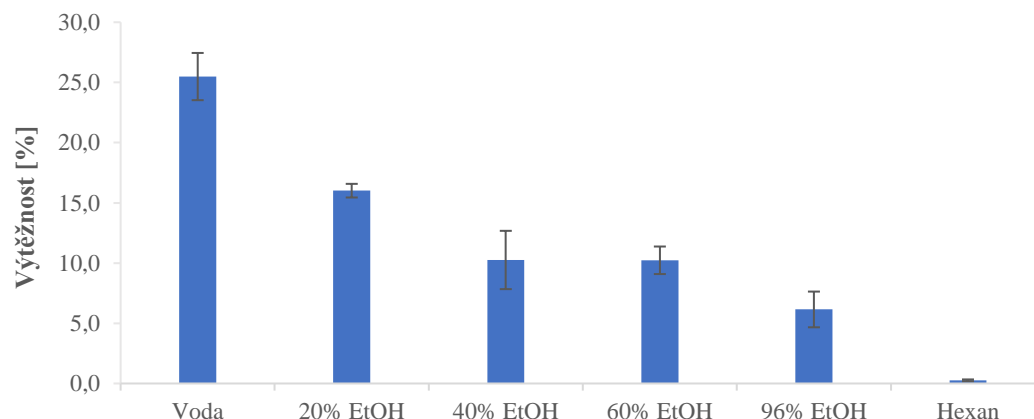
5.1.1 Extrakty z komerčně dostupných mikrořas

5.1.1.1 Celková výtěžnost extraktů

Po provedení postupu uvedeném v bodě 4.7.1 byla zjištěná hmotnostní koncentrace všech látek v extraktu vynásobena celkovým objemem extraktu a vztažena na navážku řasy. Takto vypočtené hodnoty výtěžností byly v procentech přehledně shrnuty do sloupcových grafů na následujících obrázcích (viz. Obrázek 9 a Obrázek 10).



Obrázek 9: Celková výtěžnost extraktu z řasy *Chlorella Vulgaris*



Obrázek 10: Celková výtěžnost extraktů z řasy *Spirulina sp.*

U extrakcí z obou řas lze vidět, že s rostoucí koncentrací ethanolu celková výtěžnost klesá. Extrakcí z řasy *Chlorella Vulgaris* do 96% ethanolu došlo k mírnému výkyvu od tohoto trendu a zvýšení výtěžnosti. Tento trend ovšem neprokazuje, že všechny tyto vyextrahované látky jsou látky aktivní. Jedná se pouze o celkový obsah sušiny v extraktech. Extrakce z řasy *Spirulina sp.* poskytovaly s výjimkou extraktů do 60% a 96% ethanolu mírně vyšší výtěžnosti oproti řase *Chlorella Vulgaris*. Hexanové extrakce vyextrahovaly jen velmi málo sušiny.



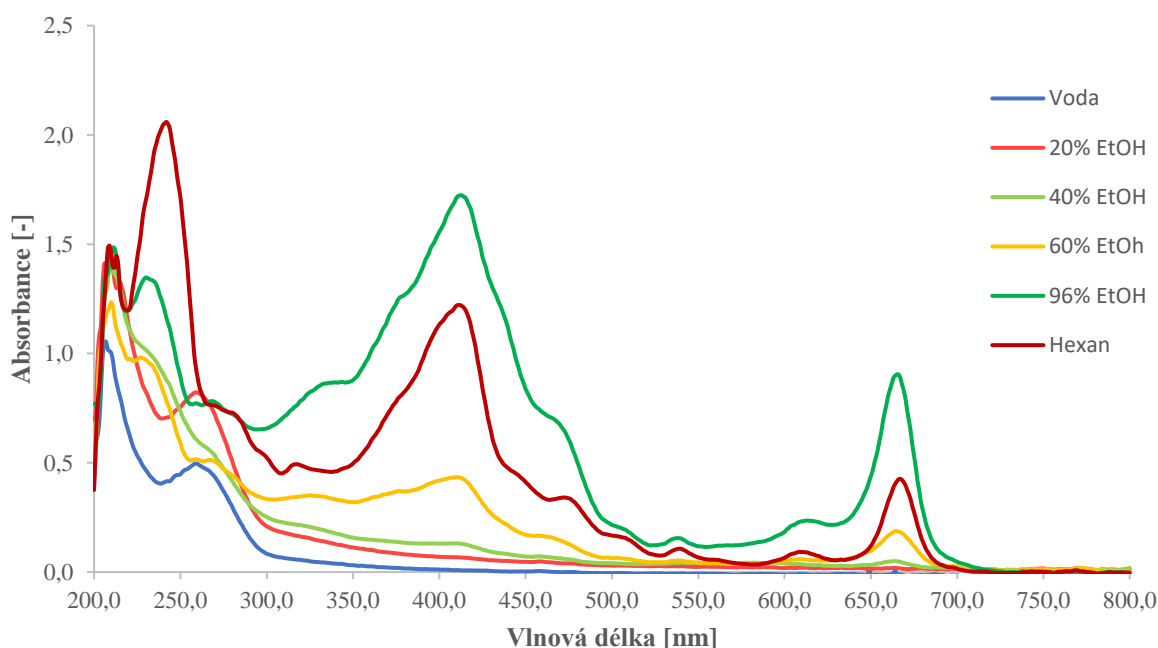
Obrázek 11: Vzhled extraktů z mikrořas

5.1.1.2 Obsah stanovovaných látek

Pro určení obsahu celkových fenolických látek v extraktech byla použita změřená kalibrační křivka kyseliny gallové (viz. Rovnice (2)). Do její rovnice byly dosazovány hodnoty absorbance změřené stejně jako tato kalibrační křivka podle postupu uvedeném v bodě 4.7.2.

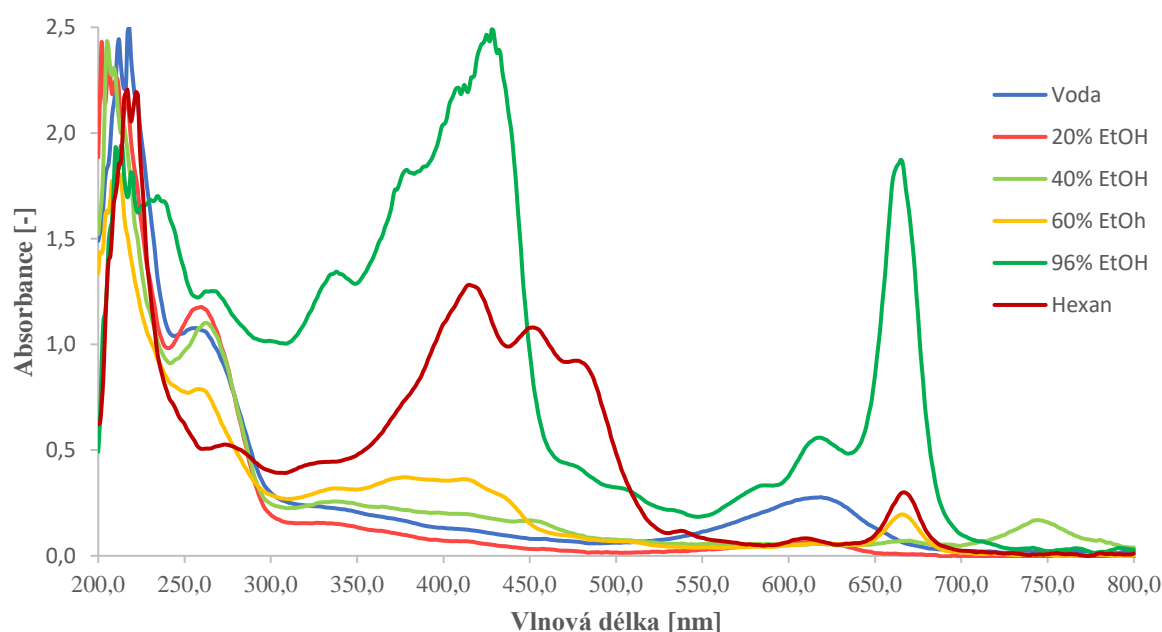
Pro stanovení koncentrace flavonoidů byla použita kalibrační křivka katechinu (viz. Rovnice (4)) změřená podle postupu v bodě 4.7.3. Do její rovnice byly dosazovány absorbance vzorků změřené podle stejného postupu.

Koncentrace dalších stanovovaných látek jako chlorofylů a karotenoidů byly vypočteny ze změřených absorpčních spekter podle postupu v bodě 4.8. Tyto spektra lze vidět na následujících grafech (viz. Obrázek 12 a Obrázek 13). Koncentrace těchto látek z nich byly vypočteny pomocí rovnic zmíněných v bodě 4.8.2.



Obrázek 12: Absorpční spektra extraktů z řasy *Chlorella Vulgaris*

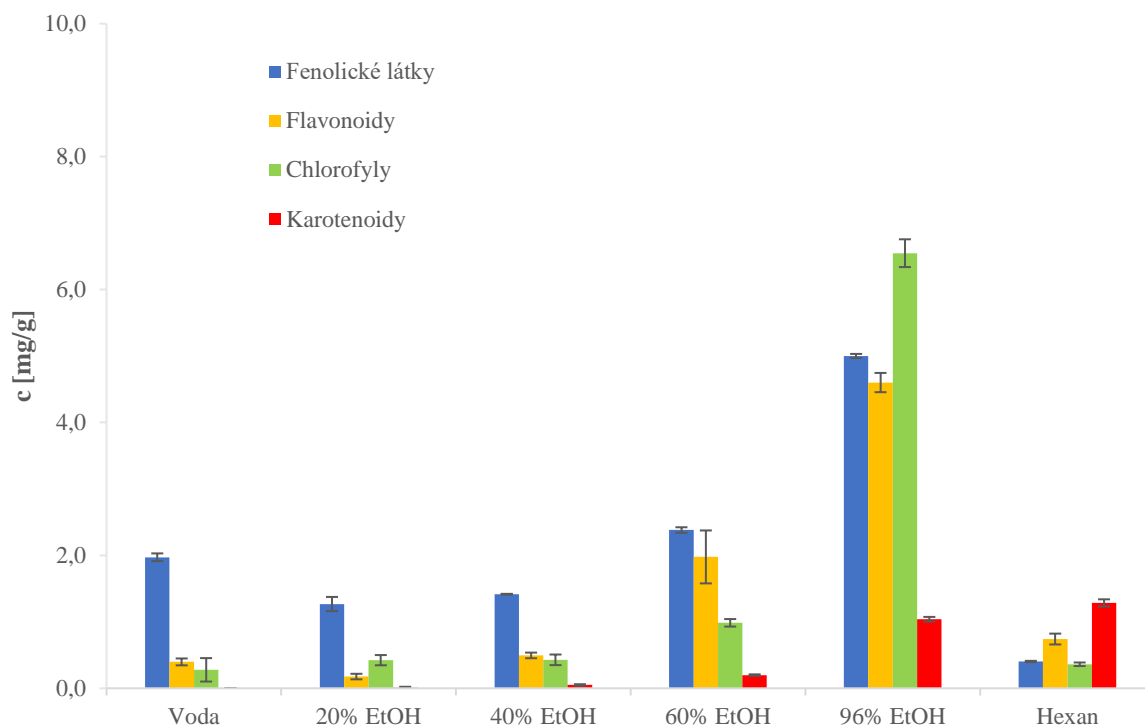
Na absorpčních spektrech z tohoto grafu lze pozorovat charakteristické píky o různé intenzitě pro látky obsažené v zelených mikrořasách jako například chlorofyly a beta karoten, či další karotenoidy (viz. Obrázek 1). Už ze spekter samotných lze vypočítat to, že nejvíce absorbujících látek z řasy *Chlorella vulgaris* vyextrahoval 96% ethanol a hexan. A to i přes to, že celkové výtěžnosti těchto extraktů vycházely poměrně nízké. To ukazuje na to, že extrakce s nižší koncentrací ethanolu extrahovaly spíše látky nebarevné a absorbující pouze v UV spektru. Se snižující se koncentrací ethanolu v extrakčním činidle se snižuje i intenzita píků a u extraktů do vody a 20% ethanolu lze pozorovat už jen píky v UVB oblasti, které určovaly SPF a píky v UVC oblasti.



Obrázek 13: Absorpční spektra extraktů z řasy *Spirulina sp.*

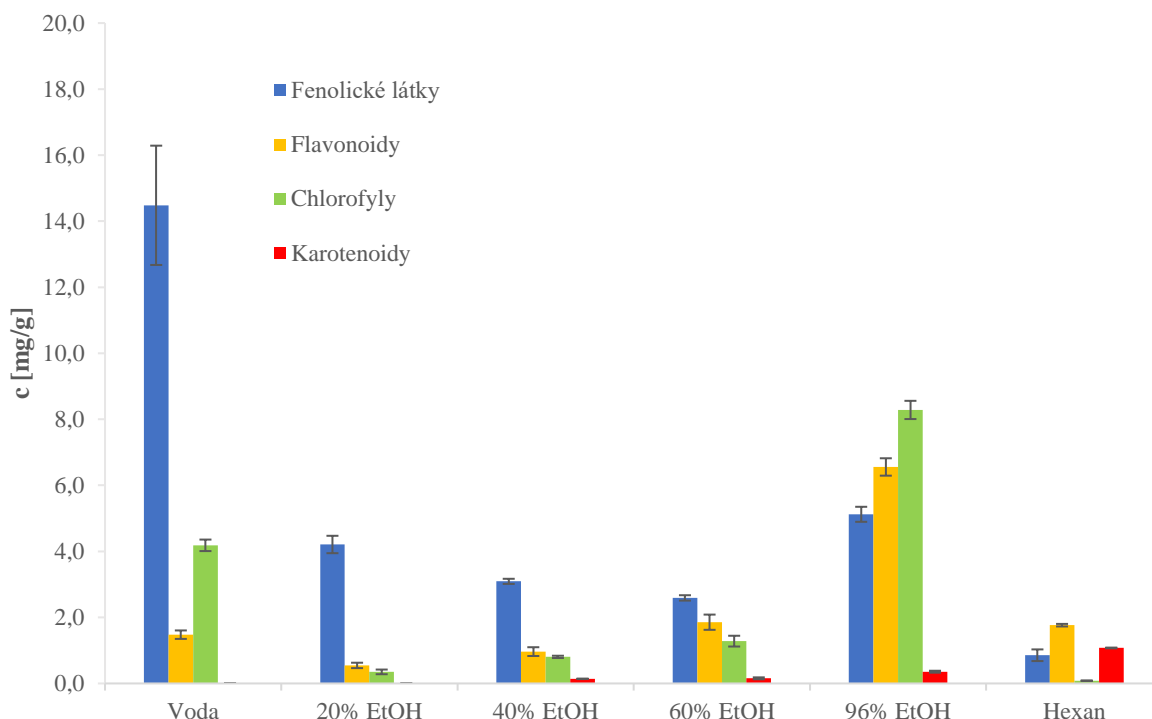
Na tomto grafu lze pro extrakty z řasy *Spirulina sp.* vypočítat podobný trend s výjimkou extrakce do destilované vody. Na tomto spektru lze pozorovat pík i okolo vlnové délky 620 nm. Tento pík byl očekáván, jelikož se extrakt jevil jako tmavě modrý (viz. Obrázek 11), tudíž by měl absorbovat v oranžové až červené oblasti spektra. Byl pravděpodobně způsoben velkým množstvím vyextrahovaného proteinu fykocyaninu. Ten ve svojí molekule obsahuje i chromofor fykobilin, který je příčinou onoho modrého zbarvení. Tento protein mikrořasy běžně obsahují a je rozpustný ve vodě, tudíž se do ní extrahoval velmi dobře [70]. Po přidání ethanolu mohlo dojít ke snížení jeho rozpustnosti a mohl tak se vysrážet a po odstředění zůstat v sedimentu. Dále lze u hexanové extrakce pozorovat výraznější píky charakteristické pro beta karoten, což se dalo také předpokládat, jelikož se jedná o lipofilní barvivo. Na druhou stranu pík charakteristický pro chlorofyly při vlnové délce 669 nm je méně výrazný, což indikovalo menší koncentraci tohoto barviva v extraktu. Ze spektra extraktu do 96% ethanolu lze vyčíst to, že se vyextrahovalo především velké množství chlorofylu a (viz. Obrázek 1). Chlorofylu b a karotenoidů se při této extrakci vyextrahovalo pravděpodobně jen malé množství.

Nakonec při porovnání výše jednotlivých píků extraktů z obou řas lze také odhadnout to, že z řasy *Spirulina sp.* bylo vyextrahováno o něco více absorbujících látek než z řasy *Chlorella Vulgaris*. To následně potvrdil výpočet koncentrací těchto látek a látek stanovovaných pomocí uvedených kalibračních křivek. Tyto koncentrace byly vztaženy na gram suché váhy řasy a přehledně shrnuty do následujících sloupcových grafů (viz. Obrázek 14 a Obrázek 15).



Obrázek 14: Obsah aktivních látek v extraktech z řasy *Chlorella Vulgaris*

Na tomto grafu lze vidět trend vzrůstající koncentrace všech stanovovaných látek v závislosti na koncentraci ethanolu v extrakčním činidle. Extrakce vodou sice vykazovala mírně vyšší koncentraci fenolických látek, ale tento výkyv není příliš výrazný. Zdaleka nejvíce všech stanovovaných látek se vyextrahovalo extrakcí 96% ethanolem. Výjimku tvořily karotenoidy, kterých bylo u hexanového extraktu více, ale to se dalo očekávat. U hexanových extraktů se ovšem vyextrahovalo velmi málo chlorofylů, stejně tak jako fenolických látek. Při měření obsahu flavonoidů v tomto extraktu došlo k poměrně velkému zkreslení výsledků, jelikož koncentrace flavonoidů vycházela vyšší než koncentrace celkových fenolických látek, což je podle teorie samotné chybný výsledek, protože by měly tvořit pouze určitý podíl z celkové koncentrace fenolických látek (viz. bod 2.6.1). Toto zkreslení výsledků mohlo být způsobeno interakcí použitých činidel při stanovení flavonoidů i s jinými vyextrahovanými lipofilními látkami.



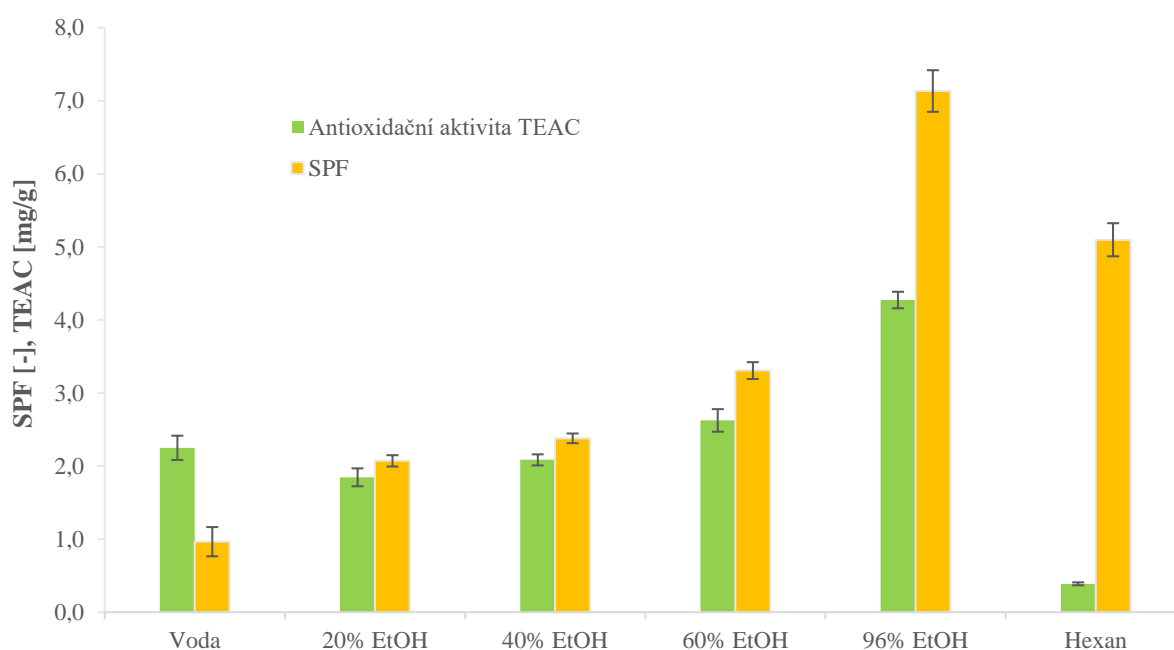
Obrázek 15: Obsah aktivních látek v extraktech z řasy *Spirulina sp.*

Výsledky extrakcí z řasy *Spirulina sp.* již tak jednoznačné nejsou. U vodné extrakce došlo k vyextrahování velkého množství fenolických látek a chlorofylů v porovnání s vodným extraktem z řasy *Chlorella Vulgaris*. Při zvýšení koncentrace ethanolu v extrakčním činidle na 20 %, koncentrace celkových fenolických látek výrazně poklesla, stejně tak jako podíl flavonoidů a chlorofylů. Karotenoidy se při těchto dvou extrakcích neextrahovaly. Při dalším zvyšování koncentrace ethanolu v extrakčním činidle se koncentrace fenolických látek v extraktech dále snižovala, ale zvyšoval se podíl flavonoidů a také koncentrace chlorofylů a karotenoidů. Chyba při stanovení flavonoidů, která se v předchozím případě vyskytla jen u hexanové extrakce se u extrakcí z této řasy vyskytla už i při extrakci 96% ethanolem. Došlo ovšem ke zvýšení koncentrace celkových fenolických látek a dalšímu zvýšení koncentrace chlorofylů a karotenoidů. U hexanové extrakce došlo opět k velkému poklesu koncentrace všech vyextrahovaných látek s výjimkou karotenoidů. Těch se ale také vyextrahovalo mírně menší množství v porovnání s hexanovou extrakcí u předešlé řasy.

Ovšem při porovnání obou grafů bylo potvrzeno to, že z řasy *Spirulina* se celkově extrahovalo více aktivních látek než z řasy *Chlorella Vulgaris*, což mohlo být způsobeno buď tím že *Spirulina sp.* obsahovala aktivních látek mnohem více, nebo se z ní tyto látky snáze uvolňovaly v důsledku slabší buněčné stěny.

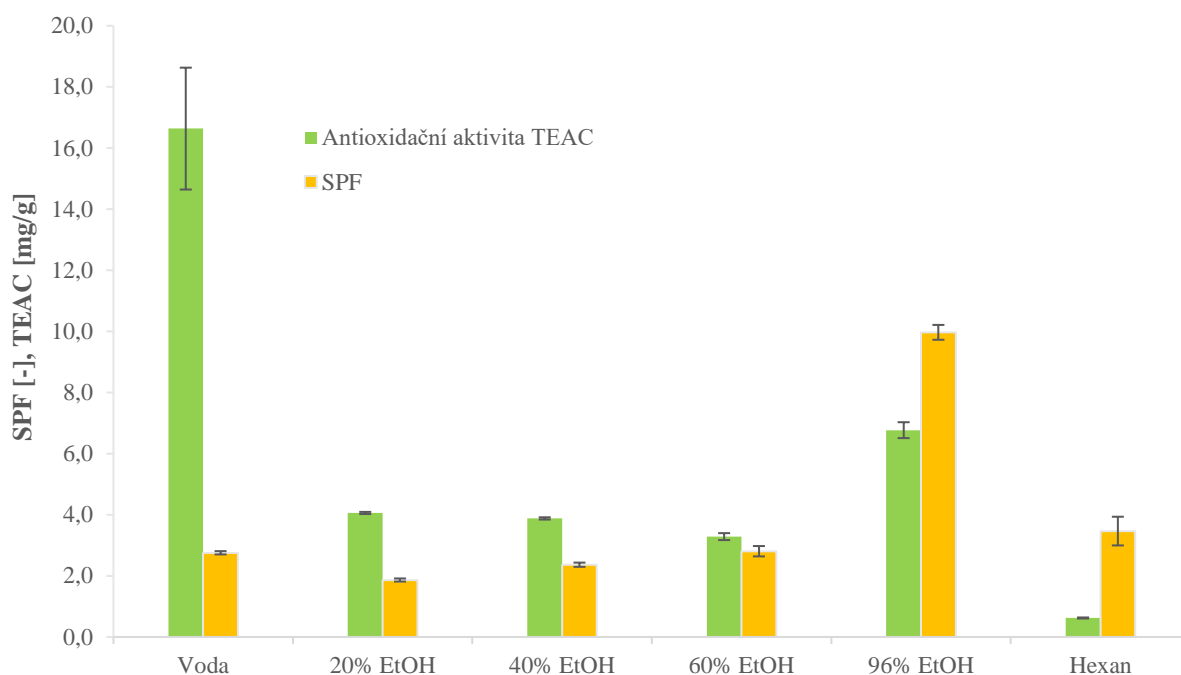
5.1.1.3 SPF a antioxidační aktivita

Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity byla změřena podle postupu v bodě 4.7.4. Stejně byly proměřeny i vzorky a naměřené změny absorbancí byly pak dosazovány do rovnice kalibrační přímky, ze které byla vypočtena koncentrace antioxidantů ve vzorku ekvivalentní koncentraci Troloxu. Tato vypočtená koncentrace byla následně vynásobena objemem extrakčního činidla a vztažena na navážku řasy. Pro výpočet SPF byly použity hodnoty absorbancí naměřené podle bodu 4.8 a SPF byl vypočten podle rovnic v uvedených v bodě 2.11. Takto vypočtené hodnoty antioxidační aktivity a SPF byly přehledně shrnuty do sloupcových grafů (viz. Obrázek 16 a Obrázek 17).



Obrázek 16: Antioxidační aktivita a SPF extraktů z řasy *Chlorella Vulgaris*

Co se antioxidační aktivity extraktů z řasy *Chlorella Vulgaris* týče, tak lze pozorovat její nárůst při zvyšování koncentrace ethanolu v extrakčním činidle. Je zde patrná jasná korelace mezi zvyšováním antioxidační aktivity a obsahem aktivních látek v extraktech, především fenolických látek. Podobným způsobem se zvyšoval i SPF extraktů. U hexanových extraktů došlo k výraznému snížení antioxidační aktivity i mírnému snížení SPF, což také odpovídá stanovené koncentraci aktivních látek v předchozím bodě s tím, že příčinou vyššího SPF budou převážně vyextrahované karotenoidy. Mohlo ovšem dojít ke snížení antioxidační aktivity a SPF v důsledku degradace aktivních látek kvůli zvýšené teplotě v průběhu této extrakce.



Obrázek 17: Antioxidační aktivita a SPF z řasy *Spirulina sp.*

Antioxidační aktivita v případě extraktů z řasy *Spirulina sp.* byla jednoznačně nejvyšší u vodného extraktu. To bylo pravděpodobně způsobeno vysokou koncentrací fenolických látek a fykocyaninu, který také má antioxidační účinky [70]. SPF byl ale výrazně menší. Po přidání ethanolu do extrakčního činidla došlo k výraznému poklesu antioxidační aktivity a mírnému poklesu SPF. Při zvyšování koncentrace ethanolu docházelo k dalšímu snižování antioxidační aktivity, ovšem jen malému. SPF se naopak mírně zvyšoval. U extrakce 96% ethanolom došlo k velkému zvýšení jak SPF, tak antioxidační aktivity. Všechny tyto změny antioxidační aktivity korelují stejně jako v předchozím případě s koncentrací především fenolických látek. U hexanových extraktů se pravděpodobně opět v důsledku zvýšení teploty při extrakci a malého obsahu nepolárních aktivních látek snížil jak SPF, tak antioxidační aktivita.

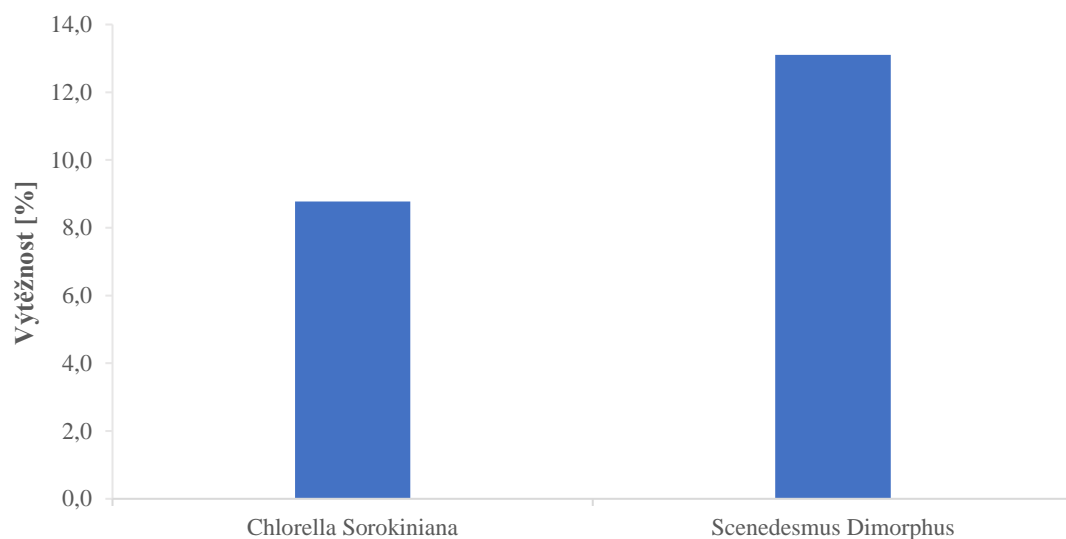
Při porovnání efektů extraktů z obou řas, lze vidět to, že extrakty z řasy *Spirulina sp.* mají mírně vyšší hodnoty u všech extraktů, to koreluje s obsahem vyextrahovaných aktivních látek jejichž koncentrace byla u extraktů ze *Spirulina sp.* také vyšší (viz. bod 5.1.2.2).

5.1.2 Extrakty ze vzorků mikrořas kultivovaných na FCH VUT

Pro extrakty ze vzorků mikrořas byla použita extrakce 96% ethanolom podle postupu uvedeném v bodě 4.5.1, jelikož ta u obou komerčně dostupných řas dopadla nejlépe, jak co se obsahu aktivních látek týče, tak i jejich efektů. Byly použity vzorky řas *Chlorella Sorokiniana* a *Scenedesmus Dimorphus*. Těchto vzorků k extrakci bylo ovšem k dispozici pouze velmi malé množství a tudíž nebylo možno získat dostatečné množství extraktů pro všechna měření. Proto v grafech nejsou uváděny směrodatné odchylky a obsah fenolických látek a flavonoidů nebyl měřen vůbec, jelikož pro tyto měření byl potřeba větší objem extraktu, než byl k dispozici.

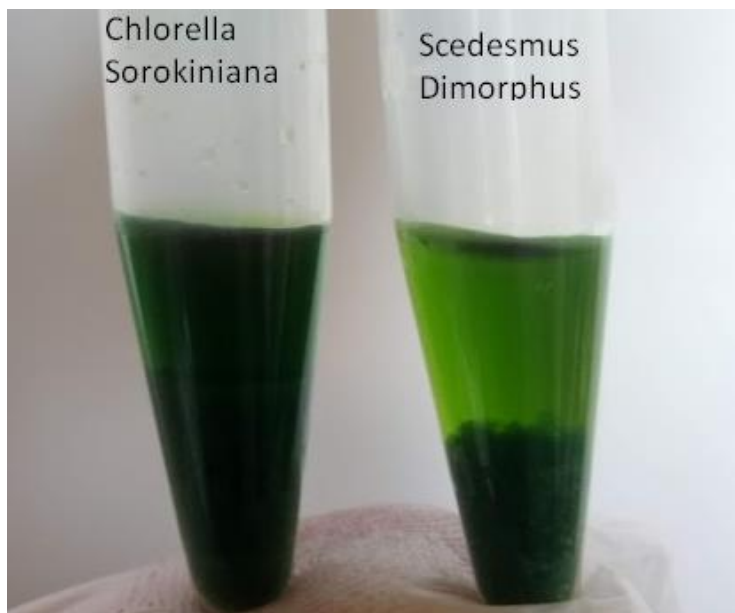
5.1.2.1 Celková výtěžnost

Celková výtěžnost vzorků byla stanovena podle postupu v bodě 4.7.1, opět vztažena na navážku řas a v procentech uvedena do následujícího grafu.



Obrázek 18: Celková výtěžnost extraktů z vzorků mikrořas

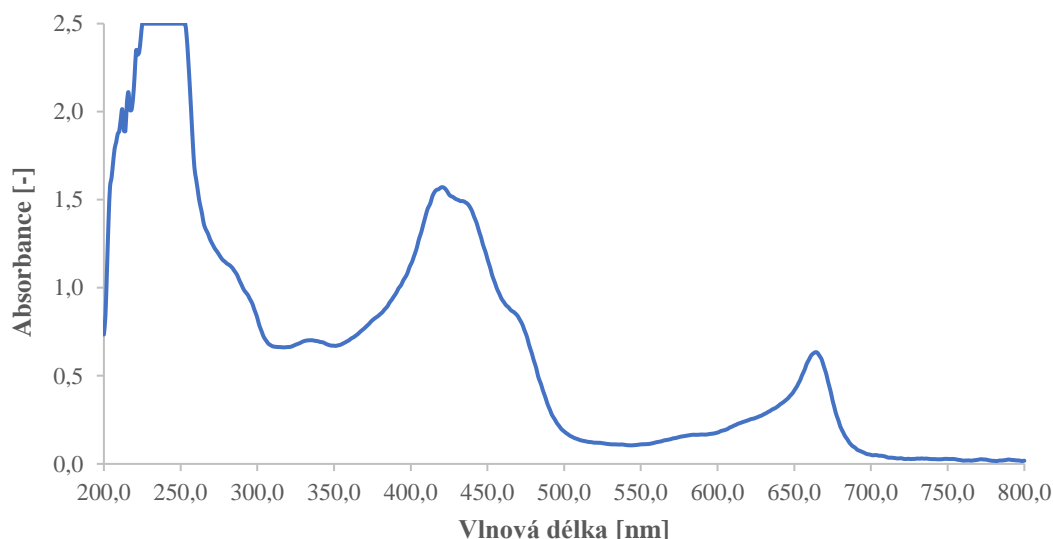
U kultivovaných mikrořas vycházela mírně vyšší výtěžnost než u extraktů do 96% ethanolu u komerčně dostupných řas, ale extrakty se jeví méně zelené než ty u komerčně dostupných řas (viz. Obrázek 19). To indikovalo především menší koncentraci vyextrahovaných chlorofylů.



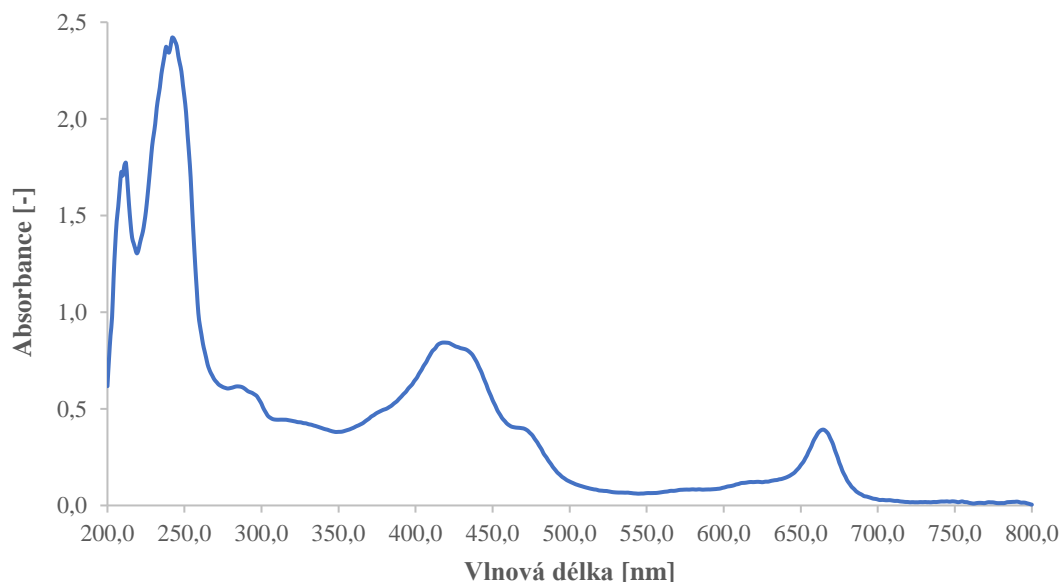
Obrázek 19: Vzhled extraktů z vzorků řas po centrifugaci

5.1.2.2 Obsah aktivních látek

Jak již bylo zmíněno výše, u kultivovaných mikrořas byl stanovován pouze obsah chlorofylů a karotenoidů, které bylo možno určit pomocí výpočtu ze změřených absorpčních spekter extraktů (viz. Obrázek 20 a Obrázek 21). Pro měření spekter byla alikvótní část vzorků 15x naředěna 96% ethanolem pro UV–VIS a proměřena podle postupu v bodě 4.8, hodnoty SPF pak byly přepočteny podle vhodného ředění.



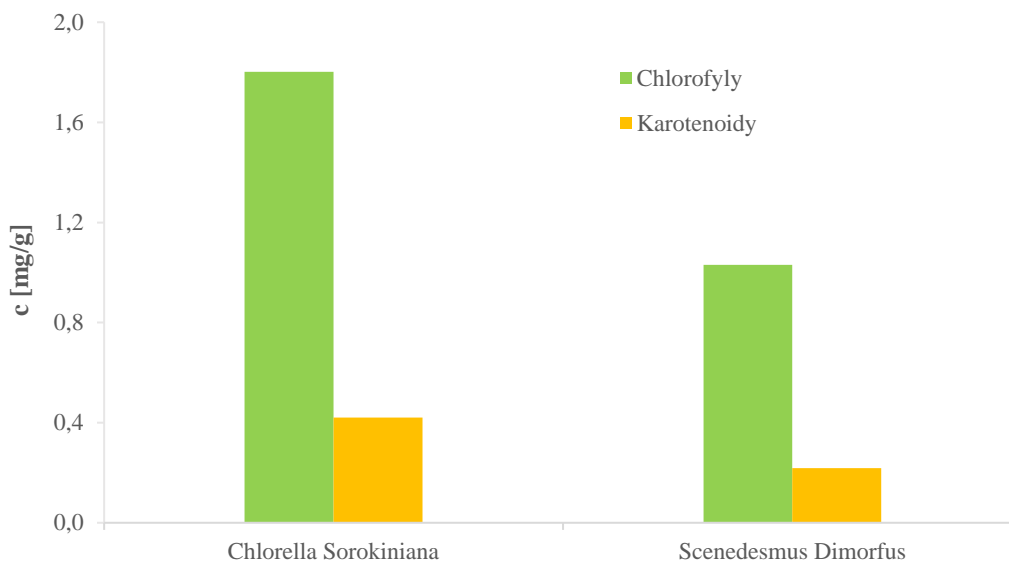
Obrázek 20: Absorpční spektrum z řasy *Chlorella Sorokiniana*



Obrázek 21: Absorpční spektrum extraktu z řasy *Scenedesmus Dimorphus*

Na těchto absorpčních spektrech lze podobně jako u extraktů z komerčně dostupných řas pozorovat charakteristické píky chlorofylů a karotenoidů. Mají ovšem menší intenzitu, což potvrzuje domněnku, že z těchto řas se vyextrahovalo méně chlorofylů. Karotenoidů se pravděpodobně extrahovalo pak ještě menší množství. V UVB a UVC oblasti

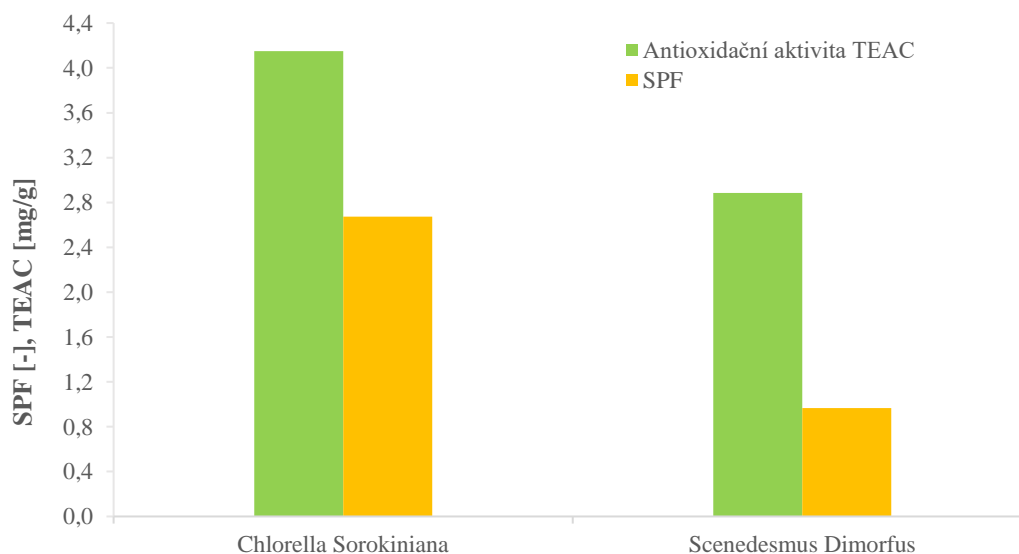
se pak vyskytovaly výrazné píky charakteristické pro fenolické látky a flavonoidy [71] přispívající k SPF a antioxidační aktivitě.



Obrázek 22: Obsah aktivních látek v extraktech z vzorků mikrořas

Výpočet koncentrace chlorofylů potvrdil, že je opravdu výrazně menší než u extraktů z komerčně dostupných mikrořas. U těch se koncentrace vyextrahovaných chlorofylů pohybovala v rozmezí 6,0–8,5 mg/g suché řasy, kdežto zde tato koncentrace nedosáhla ani 2 mg/g. Koncentrace karotenoidů se u extraktů z komerčně dostupných řas pohybovala v rozmezí 0,3–1,0 mg/g a zde bylo toto rozmezí pouze 0,2–0,4 mg/g. Tyto nižší výtěžky mohly být způsobeny nedostatečným narušením buněčné stěny těchto řas v průběhu extrakce. Také nebylo známo, jak byly komerčně dostupné vzorky řas kultivovány, tudíž mohly produkovat jiná množství barviv a aktivních látek v porovnání s těmito vzorky řas. Výtěžky mohly být zvýšeny například vortexováním extraktu se skleněnými kuličkami.

5.1.2.3 Antioxidační aktivita a SPF



Obrázek 23: Antioxidační aktivita a SPF extraktů z vzorků mikrořas

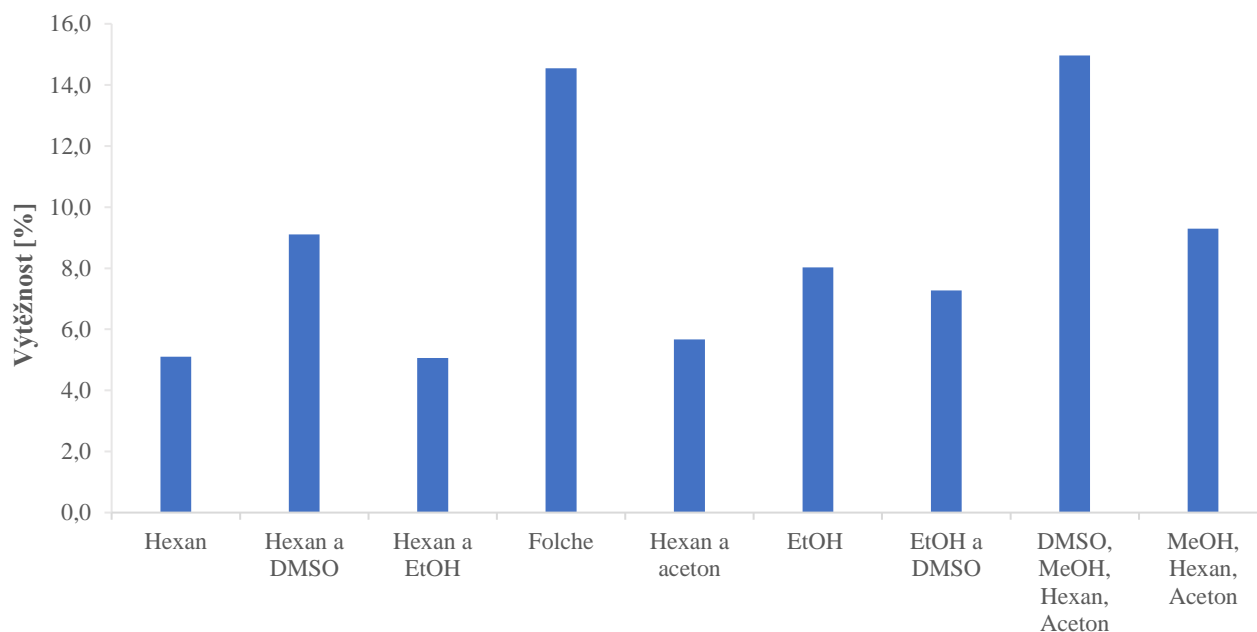
Tyto dvě vlastnosti extraktů byly stanovovány stejně jako u extraktů z komerčně dostupných řas. Byť koncentrace změřených vyextrahovaných látek byla výrazně nižší než u extraktů z komerčně dostupných řas, antioxidační aktivita se tak výrazně nesnížila. U předešlých extraktů se pohybovala koncentrace antioxidantů v rozmezí 4,2–6,8 mg/g suché váhy a u těchto extraktů v rozmezí 2,9–4,2 mg/g. Toto mohlo být způsobeno menším stářím extrahovaných řas oproti řasám komerčně dostupným. Co se SPF týče, tak ten byl u extraktů z komerčně dostupných řas v rozmezí 7,1–10 a u těchto extraktů se pohyboval v rozmezí 0,9–2,7. Došlo tedy k jeho výraznému snížení v důsledku méně účinné extrakce, nebo menší produkce aktivních látek těmito řasami.

5.2 Extrakty z karotenogenních kvasinek

5.2.1 Extrakty z kvasinky *Cystofilobasidium Macerans* kultivované na FCH VUT

5.2.1.1 Celková výtěžnost extraktů

U těchto extraktů byla celková výtěžnost určována během odpařování rozpouštědla z extraktů pomocí vakuové rotační odparky (viz. bod 4.7.1) a byla shrnuta do sloupcového grafu (viz. Obrázek 24).



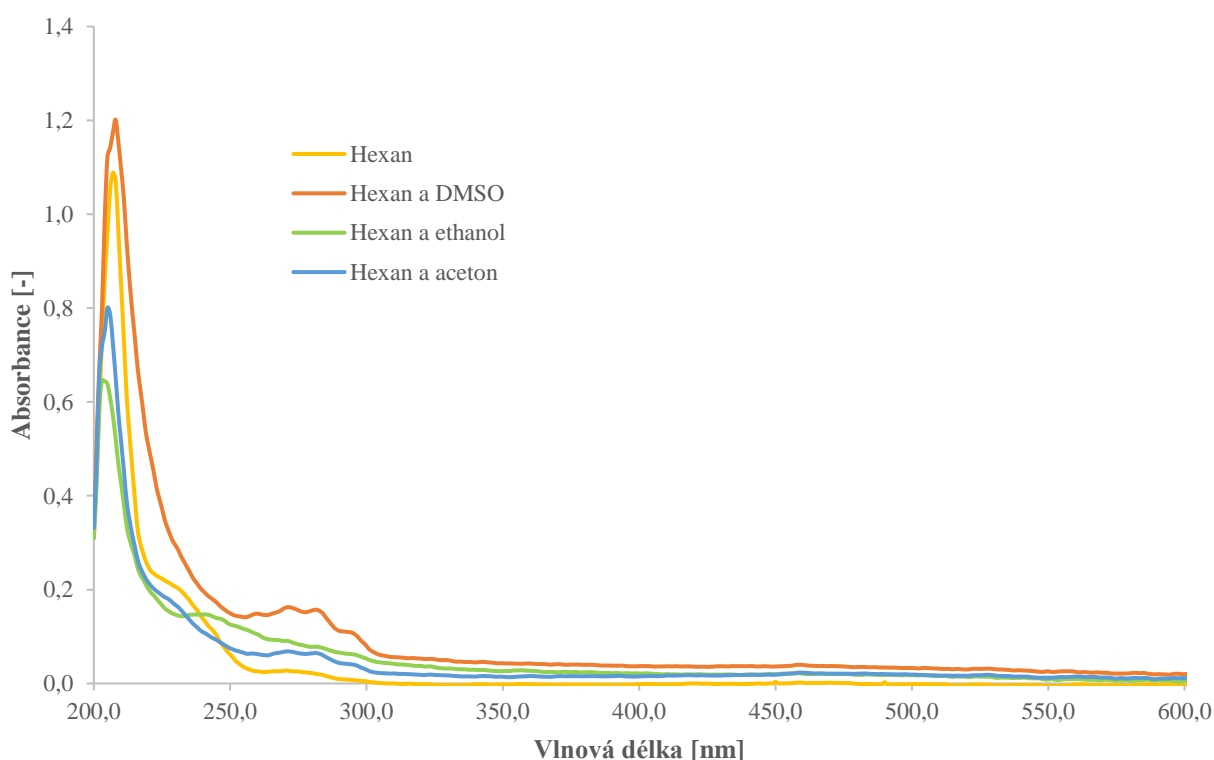
Obrázek 24: Celková výtěžnost extraktů z karotenogenních kvasinek

Z tohoto grafu lze vyčíst, že hexanová extrakce, extrakce směsí hexanu s ethanolem v poměru 1:1 a směsí hexanu a acetonu v poměru 7:3 dosahovaly nejnižších hodnot celkových výtěžností. To mohlo být způsobeno špatným rozrušením buněčné stěny kvasinek nebo špatnou rozpustností extrahovaných látek v daných rozpouštědlech. Přídavkem DMSO k hexanu pak došlo k výraznému zvýšení celkové výtěžnosti. To mohlo být způsobeno dobrou rozpustností buněčné stěny kvasinek a extrahovaných látek v DMSO. Jelikož DMSO bylo přidáváno pouze v menším množství, tak se pak vyextrahované aktivní látky daly vytřepat do hexanové fáze a dalo se tak docílit vyšší výtěžnosti. Tento efekt DMSO byl pozorován u téměř všech dalších

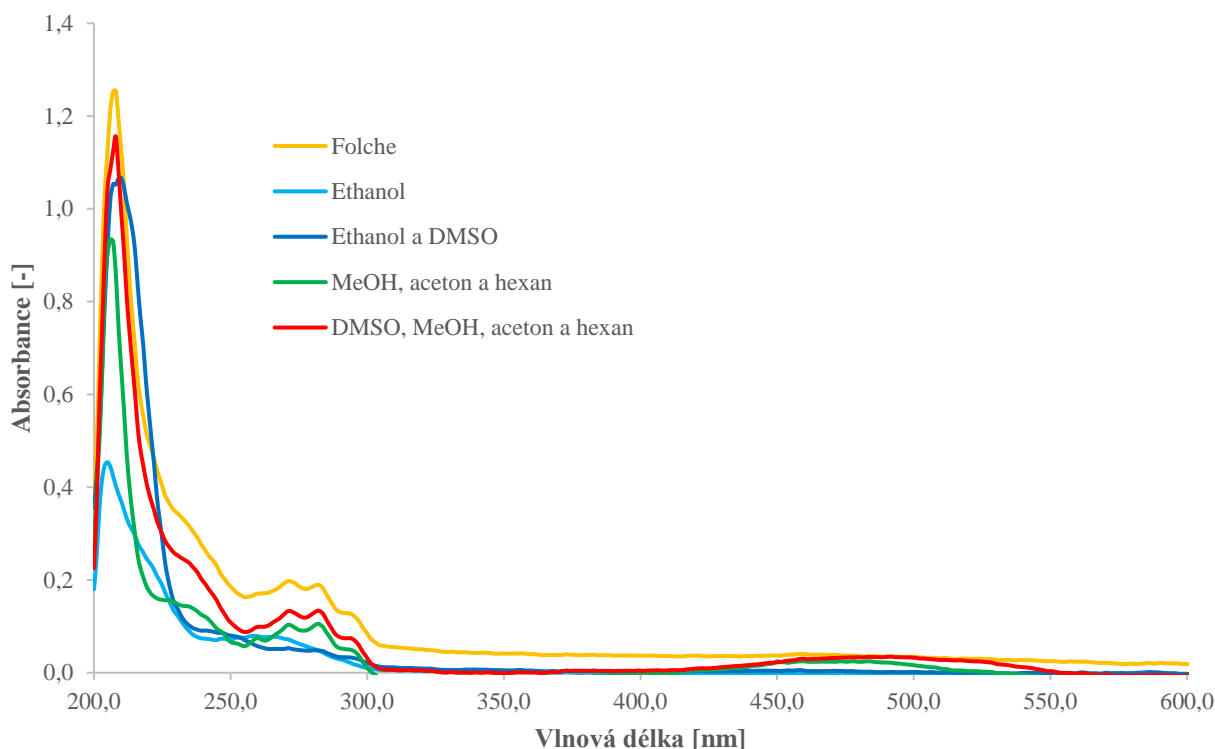
extrakcí, kromě té do 96% ethanolu. Nižší výtěžnost při této extrakci mohla ovšem být způsobena ztrátami během odstraňování DMSO z extraktu. Proto je lepší vyhnout se používání DMSO s extrakčním činidlem se kterým se mísí. Jednu z nejvyšších hodnot celkových výtěžností poskytovala extrakce dle Folche. U této extrakce byl tento výsledek očekáván, jelikož se jedná o extrakci cílenou na hydrofobní látky což karotenoidy jsou (viz. bod 2.6.2). U extrakce směsí methanolu, acetonu a hexanu byl celkový výtěžek nejvyšší co se týče extrakcí, u kterých nebyl použit DMSO. Přídavkem DMSO k této směsi rozpouštědel došlo k dalšímu zvýšení výtěžnosti a ta pak byla nejvyšší ze všech. Nicméně všechny výtěžnosti extrakcí z kvasinek byly o dost nižší než u extrakcí z mikrořas, u těch dosahovaly nejvyšších hodnot v rozmezí 18–26 %. Zde nejvyšší hodnota výtěžnosti dosáhla 15 %.

5.2.1.2 Obsah karotenoidů

Pro výpočet obsahu karotenoidů byly použity spektra změřená podle postupu uvedeném v bodě 4.8 a z nich následně vypočítána koncentrace karotenoidů podle rovnice v bodě 4.8.3.

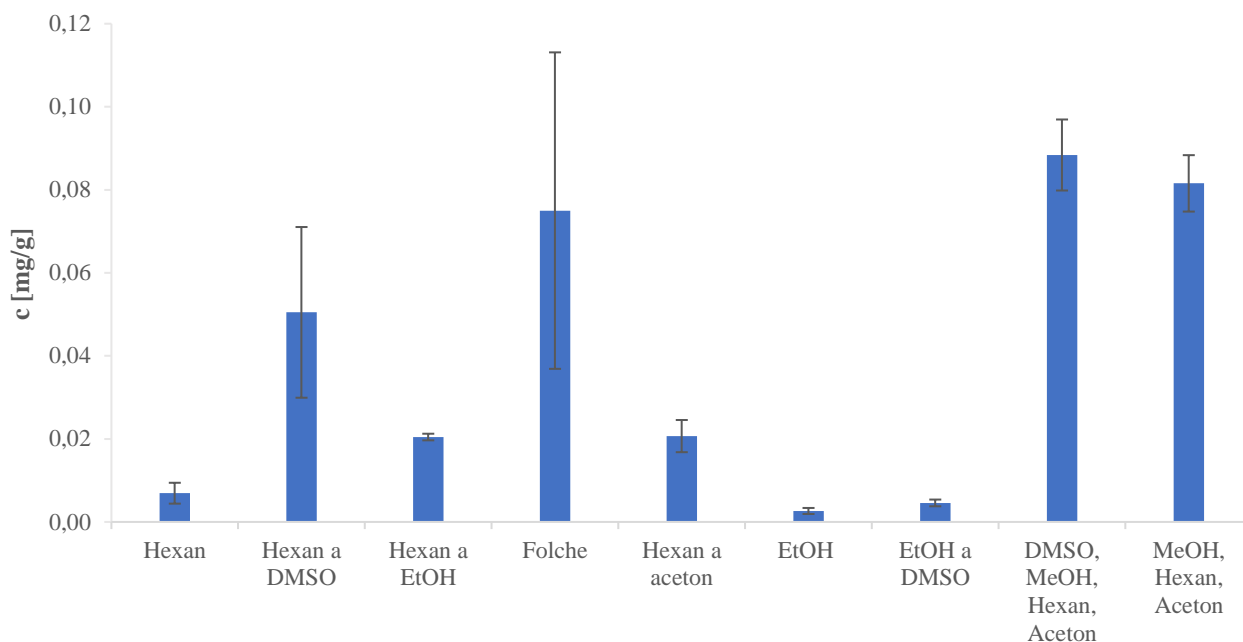


Obrázek 25: Spektra extraktů z karotenogenních kvasinek 1



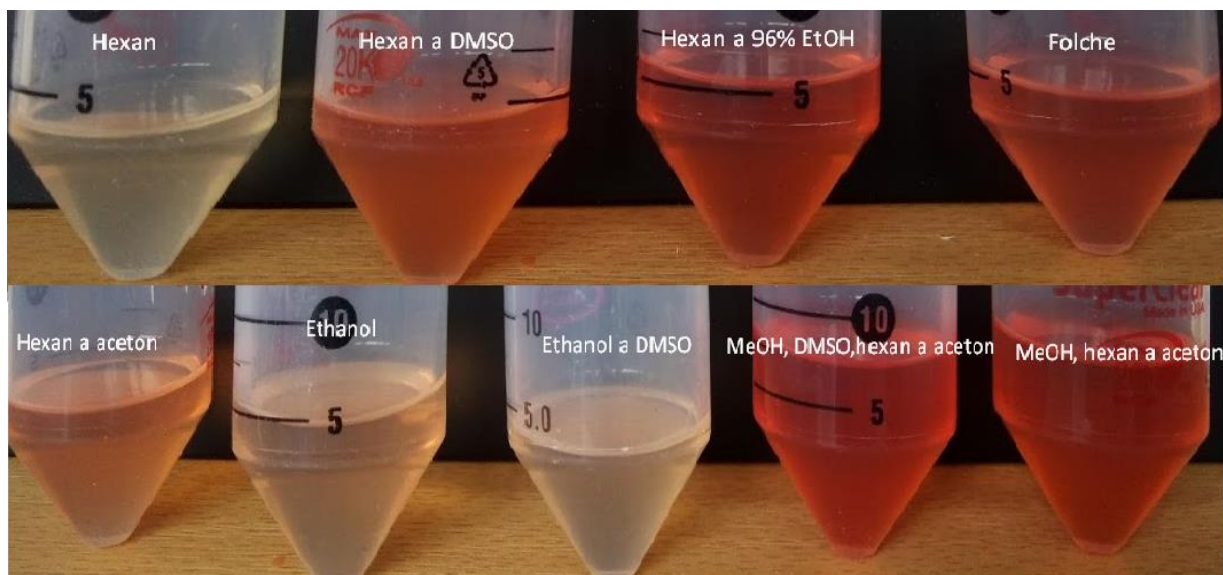
Obrázek 26: Spektra extraktů z karotenogenních kvasinek 2

Na těchto absorpčních spektrech extraktů lze vidět výrazné píky v UVC oblasti. Dále lze pozorovat méně výrazné píky na přechodu mezi UVC a UVB oblasti. Tyto píky svým tvarem připomínají charakteristický trojitý pík beta karotenu, tomu ovšem neodpovídá vlnová délka. Mohlo sice dojít k hypsochronnímu posunu absorpčních maxim karotenoidů v důsledku polarity ethanolu, ve kterém byly při měření rozpuštěny, ale posun absorpčních maxim o přibližně 200 nm se nezdá příliš pravděpodobný. Mohlo spíše dojít k potlačení charakteristických píků ve viditelné oblasti spektra v důsledku nízké koncentrace těchto chromoforů a píky v UV oblasti spektra byly pak jediné charakteristické píky, které zůstaly zachovány. Jelikož absorpční spektrum například beta karotenu a lykopenu tyto píky obsahuje [72], tak se dá tvrdit, že v extraktech jsou stále karotenoidy, i když jejich charakteristické píky ve viditelné oblasti spektra chybí. Málo výrazný pík ve viditelné oblasti spektra mezi 450 a 500 nm, který odpovídal absorpčním maximům karotenoidů ve viditelné oblasti spektra, se pak objevil u extraktu směsí rozpouštědel DMSO, methanolu, hexanu a acetonu a u stejného extraktu pouze bez DMSO. Další píky se v absorpčních spektrech nevyskytovaly.



Obrázek 27: Obsah karotenoidů v extraktech z karotenogenních kvasinek

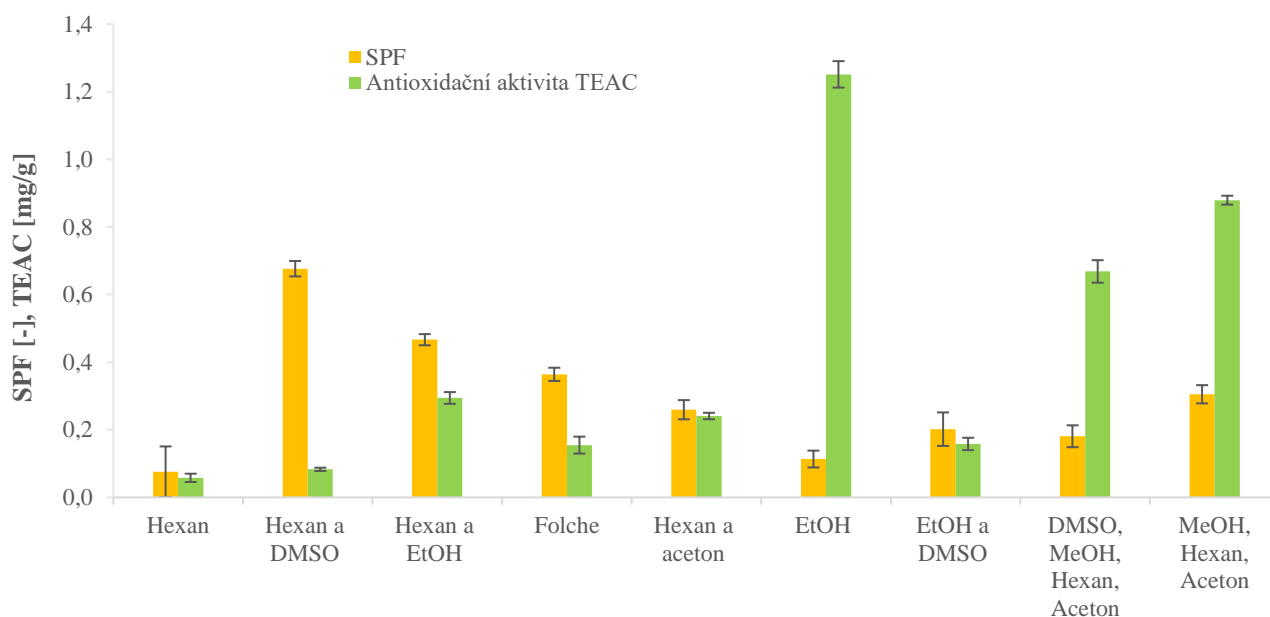
Z důvodu nízkých absorbancí při vlnové délce, při které byla počítána koncentrace se u výsledků vyskytují poměrně vysoké směrodatné odchylky (viz. výsledek u extraktu do hexanu a DMSO a u extrakce dle Folche). Nejvyšší koncentrace karotenoidů byly ovšem stanoveny u extraktů do směsi rozpouštědel DMSO, methanolu, hexanu a acetonu. Pak u stejného extraktu bez DMSO, následovala extrakce dle Folche a extrakce do hexanu a DMSO. To odpovídá intenzitě absorbancí naměřených spekter i zabarvení finálních extraktů (viz. Obrázek 28).



Obrázek 28: Konečný vzhled extraktů z karotenogenních kvasinek

5.2.1.3 Antioxidační aktivita a SPF

Antioxidační aktivita extraktů z karotenogenních kvasinek byla měřena a přepočítávána stejně jako u extraktů z mikrořas.



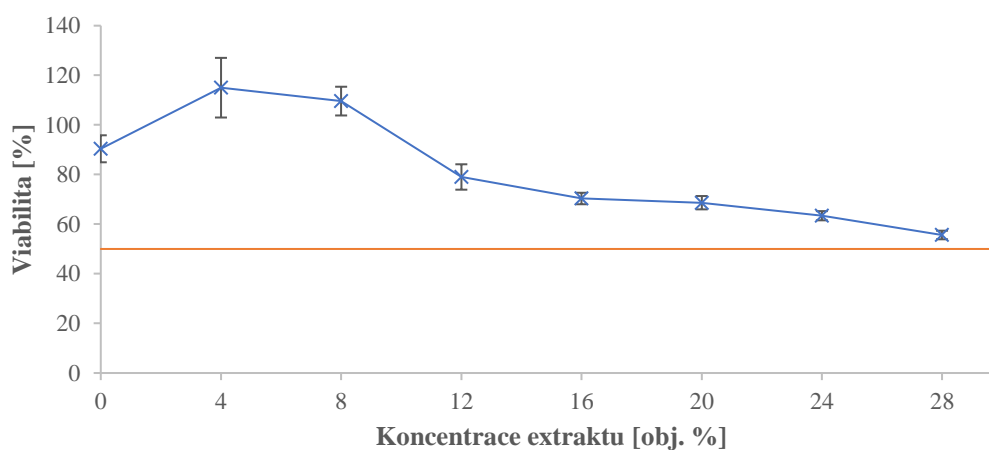
Obrázek 29: Antioxidační aktivita a SPF extraktů z karotenogenních kvasinek

Antioxidační aktivita a SPF se značně lišily extrakt od extraktu. Jednoznačně nejnižší byly u extrakce do hexanu, což bylo způsobeno, jak nízkou koncentrací karotenoidů, tak nízkou intenzitou absorpce v UV spektru. Po přidavku DMSO do extrakčního činidla se výrazně zvýšil SPF díky extrakci látek absorbujících v UV spektru. Antioxidační aktivita se ovšem příliš nezměnila. Extrakcí hexanem a 96% ethanolem se intenzita absorpce extraktu v UVB spektru snížila a s ní i SPF. Antioxidační aktivita se ovšem výrazně zvýšila. Extrakcí dle Folche došlo k dalšímu snížení SPF a tentokrát i antioxidační aktivity. SPF se dál snižoval i při extrakci pomocí hexanu a acetonu, zde ovšem došlo k výkyvu antioxidační aktivity, která se zvýšila. Extrakcí pouze 96% ethanolem se SPF opět snížil, antioxidační aktivita ovšem značně vzrostla, což mohlo být způsobeno extrakcí kyslíkatých derivátů karotenů – xantofylů (viz. bod 2.6.2.2), které mohly obsahovat více hydroxylových skupin zvyšujících jejich rozpustnost v polárních rozpouštědlech jako je například právě ethanol. Díky těmto hydroxylovým skupinám mohly i účinněji zhaset radikál kation ABTS a tak zvyšovat antioxidační aktivitu. Přídavkem DMSO se SPF sice mírně zvýšil, ale antioxidační aktivita opět značně poklesla. Tyto výkyvy naznačují, že extrakce pomocí DMSO snižuje antioxidační aktivitu. To potvrzují i dvě poslední extrakce, kde přídavek DMSO antioxidační aktivitu opět snížil oproti stejné extrakci bez DMSO. V porovnání s extrakty z mikrořas byla antioxidační aktivita i SPF a stejně tak i celková výtěžnost poměrně dost nízká, což naznačuje nižší účinnost extrakcí. To bylo pravděpodobně způsobeno nedostatečným rozrušením buněčné stěny kvasinek a tak nedokonalou extrakcí lipofilních karotenoidů. Nejlépe z těchto extrakcí ovšem podle účinků těchto extraktů dopadly extrakce do hexanu a ethanolu, zde byla jak antioxidační aktivita, tak SPF přibližně stejně vysoké a nejvyšší z extraktů. Ostatní extrakty sice měly vyšší SPF nebo antioxidační aktivitu,

ale když byla jedna z těchto vlastností takto vysoká, tak druhá byla poměrně nízká. Nejlepších výsledků by se ale dalo dosáhnout kombinací extraktu do hexanu a DMSO, který měl nejvyšší SPF, ale jednu z nejnižších antioxidačních aktivit ze všech extraktů a extraktu do ethanolu, který měl naopak jeden z nejnižších SPF ale měl nejvyšší antioxidační aktivitu.

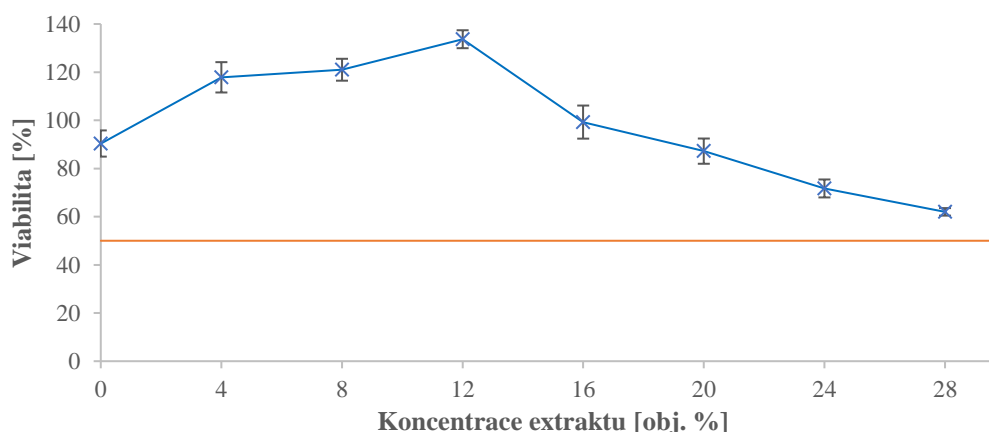
5.3 MTT test cytotoxicity extraktů z mikrořas

Pro testy cytotoxicity na lidských keratinocytech linie HaCaT byly vybrány vodné extrakty z komerčně dostupných řas *Chlorella Vulgaris* a *Spirulina sp.* a jejich cytotoxicita byla změřena podle postupu uvedeném v bodě 4.9.2. Pokud viabilita neboli životaschopnost buněk poklesla pod 50 % byla koncentrace extraktu považována za cytotoxickou.



Obrázek 30: Závislost viability lidských keratinocytů na obsahu extraktu z řasy *Chlorella*

Pro nízké koncentrace tohoto extraktu se viabilita dokonce zvyšovala oproti viabilitě buněk, ke kterým byla přidána pouze sterilní, destilovaná voda. Z tohoto lze usuzovat, že 4% a 8% koncentrace extraktu na buňky působily velmi pozitivně a pravděpodobně podporovaly jejich metabolismus. Při dalším zvyšování koncentrace ovšem už docházelo k poklesu viability, nicméně to pořád nebylo pod 50 %, tudíž by tyto koncentrace na lidskou kůži i tak výrazný negativní efekt mít neměly.



Obrázek 31: Závislost viability lidských keratinocytů na obsahu extraktu z řasy *Spirulina*

Vodný extrakt z řasy *Spirulina sp.* také nebyl pro lidské keratinocyty cytotoxický při žádné měřené koncentraci. Dokonce ještě více zvyšoval jejich viabilitu, při objemové koncentraci 12 % až na téměř 134 %. Po této hranici začala viabilita buněk opět klesat, nicméně neklesla pod 50 % a měřené koncentrace by tak také neměly mít na lidskou kůži negativní vliv.

Grafy z předchozí strany byly následně upraveny pro výpočet LC_{50} . Pro tento výpočet byla využita lineárně klesající část křivky v grafu, která byla proložena lineární spojnici trendu jejíž koeficient spolehlivosti lze vyčíst z Rovnice (13). Z rovnice této spojnice trendu pro extrakt z řasy *Chlorella Vulgaris* (viz. Rovnice (12)) bylo po dosažení viability 50 % za „y“ vypočteno „x“ (viz. Rovnice (14)). Tato hodnota představovala koncentraci tohoto extraktu odpovídající LC_{50} .

$$y = -1,342\ 9 \cdot x + 94,256\ 0 \quad (12)$$

$$R^2 = 0,962\ 8 \quad (13)$$

$$x = \left(\frac{50 - 94,256\ 0}{-1,342\ 9} \right) \text{obj. \%} = 32,96 \text{ obj. \%} \quad (14)$$

Stejným způsobem bylo vypočteno LC_{50} i extraktu z řasy *Spirulina sp.* (viz Rovnice (15) a (17)). Koeficient spolehlivosti této spojnice trendu je uveden v Rovnici (16). V tomto případě byla vypočtená hodnota LC_{50} rovna 31,44 %. Je nižší, což i odpovídá intenzivnějším účinkům tohoto extraktů (viz. Obrázek 31). Jelikož docházelo k výraznějšímu zvýšení viability, tudíž i k následným negativním účinkům při vyšších koncentracích docházelo rychleji a tak je hodnota LC_{50} nižší.

$$y = -3,182\ 5 \cdot x + 150,070\ 0 \quad (15)$$

$$R^2 = 0,993\ 1 \quad (16)$$

$$x = \left(\frac{50 - 150,070\ 0}{-3,182\ 5} \right) \text{obj. \%} = 31,44 \text{ obj. \%} \quad (17)$$

Teoreticky by oba tyto extrakty šly u kosmetických přípravků použít až ve 30% koncentraci bez výraznějších negativních účinků na lidskou kůži. Ideální by ovšem bylo použít koncentrace v rozmezí 8–12 obj.%. Oba tyto extrakty jsou totiž při těchto koncentracích naprosto netoxické a naopak výrazně podporují životaschopnost keratinocytů.

6 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala optimalizací extrakce aktivních látek z mikrořas a karotenogenních kvasinek. Poté následnou charakterizací těchto extraktů pomocí stanovení koncentrace aktivních látek, jako jsou polyfenoly, flavonoidy, chlorofyly a karotenoidy. Dále byly tyto extrakty charakterizovány pomocí stanovení antioxidační aktivity a SPF. Nakonec byla testována cytotoxicita vodných extraktů z mikrořas na lidských keratinocytech linie HaCaT.

Optimalizace extrakcí z mikrořas byla provedena na komerčně dostupných mikrořasách *Chlorella Vulgaris* a *Spirulina sp.* Byly provedeny extrakce do koncentrační řady ethanolu a extrakce do hexanu. Jako nejúčinnější byly určeny extrakce do 96% ethanolu. Tyto extrakty měly v případě obou řas nejvyšší SPF i antioxidační aktivitu korelující s vysokým obsahem především fenolických látek a karotenoidů. U vodného extraktu ze *Spiruliny sp.* sice byla vyextrahovaná koncentrace fenolických látek a s tím i antioxidační aktivita nejvyšší, ale SPF byl poměrně dosti nízký, tudíž bylo lepší pro extrakty ze vzorků použít extrakci pomocí 96% ethanolu.

Vlastní použité vzorky byly *Chlorella Sorokiniana* a *Scenedesmus Dimorfus* kultivované na FCH VUT. Těchto vzorků k extrakci bylo bohužel velmi malé množství, a tudíž nebylo možno určit veškeré zvolené charakteristiky, ale bylo zjištěno, že extrakce 96% ethanolom je na tyto vzorky podobně účinná, alespoň co se antioxidační aktivity týče. SPF byl nižší pravděpodobně kvůli nižší koncentraci vyextrahovaných karotenoidů.

Optimalizace extrakcí z karotenogenních kvasinek byla prováděna rovnou na vzorcích kvasinky *Cystofilobasidium Macerans* kultivovaných na FCH VUT. Byla provedena řada extrakcí pomocí různých rozpouštědel a bylo zjištěno, že nejúčinnější ze všech byla extrakce pomocí směsi DMSO, methanolu, hexanu a acetonu. Krom toho bylo zjištěno, že přídavky DMSO do extrakčního činidla, ať už bylo jakékoliv, výrazně zvyšují výtěžky. Ovšem z naměřených dat vyplývá, že na druhou stranu pravděpodobně snižují antioxidační aktivitu. Bohužel extrakce těmito a dalšími použitými rozpouštědly ani v kombinaci s dalšími kroky pro narušení buněčných stěn kvasinek nestačily na to, aby výtěžky a koncentrace vyextrahovaných karotenoidů byly větší, alespoň tak jako byly u extraktů z mikrořas. Toto by šlo řešit použitím například French-pressu nebo jiným zvýšením tlaku na buňky kvasinek nebo pomletím kvasinek za velmi nízké teploty (například za použití tekutého dusíku) pro lepší narušení jejich buněčných stěn. Samotná extrakce do použitých rozpouštědel by pak měla probíhat velmi dobře.

MTT test cytotoxicity vodného extraktu z řasy *Chlorella Vulgaris* prokázal to, že v nízkých koncentracích (4 %) tento extrakt dokonce podporoval metabolickou aktivitu keratinocytů a tak zvyšoval jejich měřitelnou životaschopnost až na 114,9 %. Při zvýšení koncentrace na 8 obj. % došlo k mírnému poklesu, ale pořád viabilita buněk dosahovala 109,6 %. Stejný efekt měly i extrakty z řasy *Spirulina*, jen ještě vyšší. Při 12% objemové koncentraci extraktu došlo ke zvýšení viability až na 133,7 %. Tyto podpůrné efekty extraktů byly způsobeny pravděpodobně jejich antioxidačními účinky. Buňky a jejich orgány tak nebyly poškozovány volnými radikály uvolňujícími se při biochemických reakcích, například v dýchacím řetězci. Nemusely tak vynakládat energii na zvýšenou syntézu antioxidačních enzymů pro boj s těmito radikály a mohly metabolizovat MTT účinněji. Při dalším zvyšování koncentrace však již docházelo ke snižování viability. Zde mohla zvýšená koncentrace těchto antioxidantů, které nereagovaly s volnými radikály, inhibovat určité enzymy přímo spjaté s metabolismem MTT a tak snižovat měřitelnou viabilitu. Ta mohla být také snížena v důsledku ochuzování buněk o nutrienty díky vysoké koncentraci látek z extraktů a nižší koncentraci živin. Žádná z měřených koncentrací ovšem nepůsobila přímo cytotoxicky, protože při žádné měřené koncentraci viabilita neklesla pod 50 %. Koncentrace odpovídající LC_{50} byla dopočítána pomocí spojnice trendu. U extraktu z *Chlorella Vulgaris* odpovídala 32,96 obj. % a z řasy *Spirulina sp.* 31,44 obj. %. Pokud by se tyto extrakty měly používat například do opalovacích krémů, tak by neměla jejich koncentrace překročit tyto meze, protože by pak mohlo docházet k vysychání a loupání kůže, podobně jako při erytému. Navazující práce by se mohla zabývat stanovením cytotoxicity zbylých extraktů a následnou tvorbou emulzí s těmito extrakty. Ty by ve výsledku mohly být použity jako opalovací krémy.

7 Citovaná literatura

- [1] EILER, A. Evidence for the Ubiquity of Mixotrophic Bacteria in the Upper Ocean: Implications and Consequences. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, **72**(12), 7431-7437. DOI: 10.1128/AEM.01559-06. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.01559-06>
- [2] OSTERGAARD, S., L. OLSSON a J. NIELSEN. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000, **64**(1), 34-50. DOI: 10.1128/MMBR.64.1.34-50.2000. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.64.1.34-50.2000>
- [3] KEELING, Patrick. Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *American Journal of Botany*. 2004, **91**(10), 1481-1493. DOI: 10.3732/ajb.91.10.1481. ISSN 00029122. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3732/ajb.91.10.1481>
- [4] LEGRAS, JEAN-LUC, DIDIER MERDINOGLU, JEAN-MARIE CORNUET a FRANCIS KARST. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*. 2007, **16**(10), 2091-2102. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x. ISSN 0962-1083. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x>
- [5] ABDEL-RAOUF, N., A.A. AL-HOMAIDAN a I.B.M. IBRAHEEM. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2012, **19**(3), 257-275. DOI: 10.1016/j.sjbs.2012.04.005. ISSN 1319562X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319562X12000332>
- [6] TAKAHASHI, Chika, Atsushi NUMATA, Takeshi YAMADA et al. Penostatins, novel cytotoxic metabolites from a *Penicillium* species separated from a green alga. *Tetrahedron Letters*. 1996, **37**(5), 655-658. DOI: 10.1016/0040-4039(95)02225-2. ISSN 00404039. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0040403995022252>
- [7] ZIMMERMANN, F. a K.D ENTIAN. *Yeast sugar metabolism: biochemistry, genetics, biotechnology, and applications*. 1. Lancaster: PA: Technomic Pub, 1997. ISBN 978-1-56676-466-7.
- [8] WALKER, Graeme. *Yeast Physiology and Biotechnology*. 1. Chichester: John Wiley and Sons, 1998. ISBN 978-047-1964-469.

- [9] MANNAZZU, Ilaria, Sara LANDOLFO, Teresa DA SILVA a Pietro BUZZINI. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015, **31**(11), 1665-1673. DOI: 10.1007/s11274-015-1927-x. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-015-1927-x>
- [10] RATLEDGE, Colin a Michael HALL. Accumulation of lipid by *Rhodotorula glutinis* in continuous culture. *Biotechnology Letters*. 1979, **1**(3), 115-120. DOI: 10.1007/BF01386709. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01386709>
- [11] WIRTH, Fernanda a Luciano GOLDANI. Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2012, **2012**(465717), 1-7. DOI: 10.1155/2012/465717. ISSN 1687-708X. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ipid/2012/465717/>
- [12] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. Bratislava: Alfa, 1990. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa). ISBN 80-05-00644-6.
- [13] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [14] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Vyd. 3. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2004. ISBN 80-214-2567-9.
- [15] BETINA, Vladimír. *Mikrobiológia*. 1. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1995. ISBN 80-227-0755-4.
- [16] BARSANTI, L. a Paolo GUALTIERI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. Second edition*. 2. Florida: Boca Raton, 2014. ISBN 978-143-9867-327.
- [17] KALINA, Tomáš a Jiří VÁŇA. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. 1. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 978-80-246-1036-8.
- [18] UCHIKAWA, Takuya, Akira YASUTAKE, Yoshimitsu KUMAMOTO, Isao MARUYAMA, Shoichiro KUMAMOTO a Yotaro ANDO. The influence of *Parachlorella beyerinckii* CK-5 on the absorption and excretion of methylmercury (MeHg) in mice. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2010, **35**(1), 101-105. DOI: 10.2131/jts.35.101. ISSN 0388-1350. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jts/35.101?from=CrossRef>

- [19] MASOJÍDEK, Jiří, Richard LHOTSKÝ, Jiří KOPECKÝ a Ondřej PRÁŠIL. *Mikrořasy - solární továrna v jedné buňce*. 1. Praha: Středisko společných činností AV ČR, 2016. Věda kolem nás. ISBN 978-80-270-0127-9.
- [20] JOHNSON, Matthew P. Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*. 2016, **60**(3), 255-273. DOI: 10.1042/EBC20160016. ISSN 0071-1365. Dostupné z: <https://portlandpress.com/essaysbiochem/article/60/3/255/78224/Photosynthesis>
- [21] KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahůše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 1. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1069-8.
- [22] LOUCH, William, Katherine SHEEHAN a Beata WOLSKA. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2011, **51**(3), 288-298. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.06.012. ISSN 00222828. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022282811002501>
- [23] OTOVÁ, Berta, Milada KOHOUTOVÁ a Aleš PANCZAK. *Lékařská biologie a genetika*. 1. Praha: Karolinum, 2008-2013. ISBN 978-80-246-1594-3.
- [24] ĎURAČKOVÁ, Zdena. *Volné radikály a antioxidyanty v medicíně*. 1. Bratislava: Slovak Academic Press, 1998. ISBN 80-88908-11-6.
- [25] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMÁN. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1415-1.
- [26] PRYOR, William, Kendall HOUK, Christopher FOOTE, Jon FUKUTO, Louis IGNARRO, Giuseppe SQUADRITO a Kelvin DAVIES. Free radical biology and medicine: it's a gas, man!. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2006, **291**(3), 491-511. DOI: 10.1152/ajpregu.00614.2005. ISSN 0363-6119. Dostupné z: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00614.2005>
- [27] O'DONNELL, Valerie, Jason EISERICH, Phillip CHUMLEY et al. Nitration of Unsaturated Fatty Acids by Nitric Oxide-Derived Reactive Nitrogen Species Peroxynitrite, Nitrous Acid, Nitrogen Dioxide, and Nitronium Ion. *Chemical Research in Toxicology*. 1999, **12**(1), 83-92. DOI: 10.1021/tx980207u. ISSN 0893-228X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/tx980207u>

- [28] GUADAGNINI, Lorella a Domenica TONELLI. Carbon electrodes unmodified and decorated with silver nanoparticles for the determination of nitrite, nitrate and iodate. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013, **188**, 806-814. DOI: 10.1016/j.snb.2013.07.077. ISSN 09254005. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400513008745>
- [29] HORD, Norman, Yaoping TANG a Nathan BRYAN. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009, **90**(1), 1-10. DOI: 10.3945/ajcn.2008.27131. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/90/1/1/4596750>
- [30] BECKMAN, J. a W. KOPPENOL. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1996, **271**(5), 1424-1437. DOI: 10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424. ISSN 0363-6143. Dostupné z: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424>
- [31] THIRUMURUGAN, Durairaj, Alagappan CHOLARAJAN, Suresh RAJA a Ramasamy VIJAYAKUMAR. An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. *Secondary Metabolites - Sources and Applications*. InTech, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.79766. ISBN 978-1-78923-642-2. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/secondary-metabolites-sources-and-applications/an-introductory-chapter-secondary-metabolites>
- [32] MATÉS, JosÉ, Cristina PÉREZ-GÓMEZ a Ignacio DE CASTRO. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 1999, **32**(8), 595-603. DOI: 10.1016/S0009-9120(99)00075-2. ISSN 00099120. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912099000752>
- [33] RACEK, Jaroslav. *Oxidační stres a jeho ovlivnění*. 1. Praha: Galén, 2003. Repetitorium. ISBN 80-726-2231-5.
- [34] REIS GIADA, Maria de Lourdes. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. InTech, 2013. DOI: 10.5772/51687. ISBN 978-953-51-1123-8. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/food-phenolic-compounds-main-classes-sources-and-their-antioxidant-power>
- [35] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2., opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 978-80-200-0600-4.

- [36] RAFFA, Demetrio, Benedetta MAGGIO, Maria RAIMONDI, Fabiana PLESCIA a Giuseppe DAIDONE. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, **2017**(142), 213-228. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.07.034. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523417305561>
- [37] LACHMAN, Jaromír. *Chemie II: organická chemie*. 1. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2003. ISBN 80-213-1021-9.
- [38] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 2., přeprac. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2005. ISBN 80-863-6911-0.
- [39] BERNSTEIN, Paul, Binxing LI, Preejith VACHALI, Aruna GORUSUPUDI, Rajalekshmy SHYAM, Bradley HENRIKSEN a John NOLAN. Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2016, **50**, 34-66. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.10.003. ISSN 13509462. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350946215000865>
- [40] TAKAICHI, Shinichi. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs*. 2011, **9**(6), 1101-1118. DOI: 10.3390/md9061101. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/9/6/1101>
- [41] DI MASCIO, Paolo, Stephan KAISER a Helmut SIES. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1989, **274**(2), 532-538. DOI: 10.1016/0003-9861(89)90467-0. ISSN 00039861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003986189904670>
- [42] CHENG, Ho, Georgios KOUTSIDIS, John LODGE, Ammar ASHOR, Mario SIERVO a José LARA. Tomato and lycopene supplementation and cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2017, **257**, 100-108. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.01.009. ISSN 00219150. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915017300102>
- [43] LOBO, Glenn, Jaume AMENGUAL, Grzegorz PALCZEWSKI, Darwin BABINO a Johannes VON LINTIG. Mammalian Carotenoid-oxygenases: Key players for carotenoid function and homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2012, **1821**(1), 78-87. DOI: 10.1016/j.bbalip.2011.04.010. ISSN 13881981. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138819811100062X>

- [44] NÚÑEZ-PONS, Laura, Conxita AVILA, Giovanna ROMANO, Cinzia VERDE a Daniela GIORDANO. UV-Protective Compounds in Marine Organisms from the Southern Ocean. *Marine Drugs*. 2018, **16**(9). DOI: 10.3390/md16090336. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/16/9/336>
- [45] DALLEN, Maria. *Zelené potraviny: když jídlo je naším lékem : mladá pšenice, mladý ječmen, alfalfa, chlorella, spirulina, mořské řasy, zelenina*. 1. Praha: Ratio Bona, 2010. ISBN 978-80-254-4590-7.
- [46] BURRI, Betty, Michael LA FRANO a Chenghao ZHU. Absorption, metabolism, and functions of β -cryptoxanthin. *Nutrition Reviews*. 2016, **74**(2), 69-82. DOI: 10.1093/nutrit/nuv064. ISSN 0029-6643. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1093/nutrit/nuv064>
- [47] ZINGG, Jean-Marc. Vitamin E: An overview of major research directions. *Molecular Aspects of Medicine*. 2007, **28**(5-6), 400-422. DOI: 10.1016/j.mam.2007.05.004. ISSN 00982997. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299707000556>
- [48] ANDRADE, Lidiane M. *Chlorella and Spirulina Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview*. 2018, **6**(1). DOI: 10.15406/mojfpt.2018.06.00144. ISSN 2381182X. Dostupné z: <https://medcraveonline.com/MOJFPT/chlorella-and-spirulina-microalgae-as-sources-of-functional-foods-nutraceuticals-and-food-supplements-an-overview.html>
- [49] RE, Roberta, Nicoletta PELLEGRINI, Anna PROTEGGENTE, Ananth PANNALA, Min YANG a Catherine RICE-EVANS. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, **26**(9-10), 1231-1237. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584998003153>
- [50] PALLAUF, Kathrin, Nils DUCKSTEIN, Mario HASLER, Lars-Oliver KLOTZ a Gerald RIMBACH. Flavonoids as Putative Inducers of the Transcription Factors Nrf2, FoxO, and PPAR γ . *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017, **2017**, 1-11. DOI: 10.1155/2017/4397340. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/4397340/>
- [51] NAKAGAKI, Shirley, Gabriel FERREIRA, Geani UCOSKI a Kelly DIAS DE FREITAS CASTRO. Chemical Reactions Catalyzed by Metalloporphyrin-Based Metal-Organic Frameworks. *Molecules*. 2013, **18**(6), 7279-7308. DOI: 10.3390/molecules18067279. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/6/7279>

- [52] DIXIT, Vaibhav. A simple model to solve a complex drug toxicity problem. *Toxicology Research*. 2019, **8**(2), 157-171. DOI: 10.1039/C8TX00261D. ISSN 2045-452X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/toxres/article/8/2/157-171/5553428>
- [53] CELIS, J.E. *Cell biology: a laboratory handbook*. 1. Academic Press, 2006. ISBN 978-0-12-164730-8.
- [54] ABSHER, Marlene. Hemocytometer Counting. *Tissue Culture*. Elsevier, 1973, , 395-397. DOI: 10.1016/B978-0-12-427150-0.50098-X. ISBN 9780124271500. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012427150050098X>
- [55] CIAPETTI, G., E. CENNI, L. PRATELLI a A. PIZZOFERRATO. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*. 1993, **14**(5), 359-364. DOI: 10.1016/0142-9612(93)90055-7. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0142961293900557>
- [56] LAJČÍKOVÁ, A. a L. PEKÁREK. Ultraviolet Radiation and its Health Impact. *Hygiena*. 2009, **54**(2), 57-61.
- [57] RAJAN, Vijisha, T.K. SHAMEERA AHAMED a K. MURALEEDHARAN. Studies on the UV filtering and radical scavenging capacity of the bitter masking flavanone Eriodictyol. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2018, **185**, 254-261. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.06.017. ISSN 10111344. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134418304512>
- [58] AKIMBEKOV, Nuraly, Richard ORTOSKI a Mohammed RAZZAQUE. Effects of sunlight exposure and vitamin D supplementation on HIV patients. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2020, **200**. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2020.105664. ISSN 09600760. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960076019302481>
- [59] ETTLER, Karel. *Fotoprotekce kůže: ochrana kůže před účinky ultrafialového záření*. 1. Praha: Triton, 2004. ISBN 80-725-4463-2.
- [60] GALANAKIS, Charis, Philippos TSATALAS a Ioannis GALANAKIS. *Phenols from olive mill wastewater and other natural antioxidants as UV filters in sunscreens*. 2018, **9**, 160-168. DOI: 10.1016/j.eti.2017.12.002. ISSN 23521864. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352186417303322>

- [61] SILVIA DÍAZ-CRUZ, M., Marta LLORCA, Damià BARCELÓ a Damià BARCELÓ. Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008, **27**(10), 873-887. DOI: 10.1016/j.trac.2008.08.012. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993608001878>
- [62] DANOVARO, Roberto, Lucia BONGIORNI, Cinzia CORINALDESI, Donato GIOVANNELLI, Elisabetta DAMIANI, Paola ASTOLFI, Lucedio GRECI a Antonio PUSCEDDU. Sunscreens Cause Coral Bleaching by Promoting Viral Infections. *Environmental Health Perspectives*. 2008, **116**(4), 441-447. DOI: 10.1289/ehp.10966. ISSN 0091-6765. Dostupné z: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.10966>
- [63] MALSAWMTLUANGI, C., Deepak KUMAR NATH, Italini JAMATIA, E. ZARZOLIANA a Laldusanga PACHUAU. Determination of Sun Protection Factor (SPF) number of some aqueous herbal extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013, **2013**(3), 150-151. DOI: 10.7324/JAPS.2013.3925. ISSN 22313354. Dostupné z: http://www.japsonline.com/abstract.php?article_id=1065
- [64] SARAF, Swarnlata a ChanchalDeep KAUR. In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. *Pharmacognosy Research*. 2010, **2**(1). DOI: 10.4103/0974-8490.60586. ISSN 0974-8490. Dostupné z: <http://www.phcogres.com/text.asp?2010/2/1/22/60586>
- [65] SAINI, Ramesh a Young-Soo KEUM. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*. 2018, **240**, 90-103. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.07.099. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617312529>
- [66] FOLCH, Jordi, I. ASCOLI, M. LEES, J. MEATH a F. LEBARON. Preparation of lipid extracts from brain tissue. *Journal of Biological Chemistry*. 1951, **191**(2), 833-841.
- [67] BIEHLER, Eric, Frédéric MAYER, Lucien HOFFMANN, Elmar KRAUSE a Torsten BOHN. Comparison of 3 Spectrophotometric Methods for Carotenoid Determination in Frequently Consumed Fruits and Vegetables. *Journal of Food Science*. 2010, **75**(1), 55-61. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01417.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2009.01417.x>
- [68] LICHTENTHALER, Hartmut a Claus BUSCHMANN. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001, **1**(1), 431-438. DOI: 10.1002/0471142913.faf0403s01. ISSN 25725599. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142913.faf0403s01>

- [69] MARTÍNEZ, Juan, Carlota DELSO, Javier ANGULO, Ignacio ÁLVAREZ a Javier RASO. *Pulsed electric field-assisted extraction of carotenoids from fresh biomass of Rhodotorula glutinis*. 2018, **47**, 421-427. DOI: 10.1016/j.ifset.2018.04.012. ISSN 14668564. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856418303266>
- [70] MUNAWAROH, Heli, Gun GUMILAR, Chindiar ALIFIA et al. Photostabilization of phycocyanin from *Spirulina platensis* modified by formaldehyde. *Process Biochemistry*. 2020, **94**, 297-304. DOI: 10.1016/j.procbio.2020.04.021. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511319317131>
- [71] KONG, Kin, Sarni MAT-JUNIT, Amin ISMAIL, Norhaniza AMINUDIN a Azlina ABDUL-AZIZ. Polyphenols in *Barringtonia racemosa* and their protection against oxidation of LDL, serum and haemoglobin. *Food Chemistry*. 2014, **146**, 85-93. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.012. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613012521>
- [72] TAN, Barrie a David SODERSTROM. Qualitative aspects of UV-vis spectrophotometry of beta-carotene and lycopene. *Journal of Chemical Education*. 1989, **66**(3). DOI: 10.1021/ed066p258. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed066p258>

8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Absorpční spektra chlorofylů a beta karotenu [20]	16
Obrázek 2: Třídy fenolických látek [34]	22
Obrázek 3: Třídy flavonoidů [36]	23
Obrázek 4: Příklady karotenů [43], [44]	25
Obrázek 5: Příklady xantofylů [44].....	26
Obrázek 6: Struktura vitamínů E [47]	26
Obrázek 7: Struktura Troloxu [50] a radikál kationu ABTS [51]	27
Obrázek 8: Přístroj Soxtherm a pro něj určená skleněná nádoba s papírovou patronou.....	34
Obrázek 9: Celková výtěžnost extraktu z řasy <i>Chlorella Vulgaris</i>	40
Obrázek 10: Celková výtěžnost extraktů z řasy <i>Spirulina</i> sp.....	40
Obrázek 11: Vzhled extraktů z mikrořas.....	41
Obrázek 12: Absorpční spektra extraktů z řasy <i>Chlorella Vulgaris</i>	41
Obrázek 13: Absorpční spektra extraktů z řasy <i>Spirulina</i> sp.	42
Obrázek 14: Obsah aktivních látek v extraktech z řasy <i>Chlorella Vulgaris</i>	43
Obrázek 15: Obsah aktivních látek v extraktech z řasy <i>Spirulina</i> sp.	44
Obrázek 16: Antioxidační aktivita a SPF extraktů z řasy <i>Chlorella Vulgaris</i>	45
Obrázek 17: Antioxidační aktivita a SPF z řasy <i>Spirulina</i> sp.	46
Obrázek 18: Celková výtěžnost extraktů z vzorků mikrořas	47
Obrázek 19: Vzhled extraktů z vzorků řas po centrifugaci	47
Obrázek 20: Absorpční spektrum z řasy <i>Chlorella Sorokiniana</i>	48
Obrázek 21: Absorpční spektrum extraktu z řasy <i>Scenedesmus Dimorphus</i>	48
Obrázek 22: Obsah aktivních látek v extraktech z vzorků mikrořas.....	49
Obrázek 23: Antioxidační aktivita a SPF extraktů z vzorků mikrořas.....	49
Obrázek 24: Celková výtěžnost extraktů z karotenogenních kvasinek.....	50
Obrázek 25: Spektra extraktů z karotenogenních kvasinek 1	51
Obrázek 26: Spektra extraktů z karotenogenních kvasinek 2	52
Obrázek 27: Obsah karotenoidů v extraktech z karotenogenních kvasinek.....	53
Obrázek 28: Konečný vzhled extraktů z karotenogenních kvasinek	53
Obrázek 29: Antioxidační aktivita a SPF extraktů z karotenogenních kvasinek	54
Obrázek 30: Závislost viability lidských keratinocytů na obsahu extraktu z řasy <i>Chlorella</i> ...	55
Obrázek 31: Závislost viability lidských keratinocytů na obsahu extraktu z řasy <i>Spirulina</i> ...	55

9 Seznam tabulek

Tabulka 1: Hodnoty konstant $EE \times I$ pro jednotlivé vlnové délky [64]	30
--	----

10 Seznam použitých zkratek

SPF: Faktor ochrany před slunečním zářením

UV záření: Ultrafialové záření

UVA: Ultrafialové záření v oblasti od 400 nm do 320 nm

UVB: Ultrafialové záření v oblasti od 320 nm do 280 nm

UVC: Ultrafialové záření v oblasti od 280 nm do 100 nm

DNA: Deoxyribonukleová kyselina

ATP: Adenosin trifosfát

ROS: Reaktivní částice kyslíku

RNS: Reaktivní částice dusíku

TEAC: Antioxidační kapacita ekvivalentní Troloxu

Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

ABTS: 2,2'-azinobis[3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát]

LC: Smrtná koncentrace

LD: Smrtná dávka

IC: Inhibiční koncentrace

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid

RPM: Rotace za minutu

DMSO: Dimethyl sulfoxid

Na₂CO₃: Uhličitan draselný

NaNO₂: Dusitan sodný

AlCl₃: Chlorid hlinitý

NaOH: Hydroxid sodný

UV-VIS: Ultrafialově-viditelné spektrum

CC: Kontrola buněk

VC: Kontrola rozpouštědla

SDS: Dodecylsírán sodný